

**Funktionelle Charakterisierung des 26S Proteasoms unter
Nutzung *in vitro* generierter Ubiquitin-konjugierter Substrate**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Annett Helfrich
geboren am 08.09.1975 in Rostock

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter-Michael Klotzel
2. Prof. Dr. Burkhardt Dahlmann
3. Prof. Dr. Dieter H. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 26.09.2006

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | DAS UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEM | 1 |
| 1.1.1 | Substratauswahl | 1 |
| 1.1.1.1 | Ubiquitinierung zur Markierung..... | 1 |
| 1.1.1.2 | Deubiquitinierung zur Prozessierung oder als Korrektiv..... | 3 |
| 1.1.2 | Substratprozessierung durch das Proteasom | 5 |
| 1.1.2.1 | Das 20S Proteasom – der proteolytische <i>core</i> -Partikel | 5 |
| 1.1.2.2 | Das 26S Proteasom – die Funktion des 19S Regulators (PA700) | 8 |
| 1.1.2.3 | Das Hybridproteasom und der PA28-20S-Komplex – die Funktion von PA28 | 12 |
| 1.2 | DAS UPS ALS BESTANDTEIL DER ZELLVERMITTELTEN IMMUNANTWORT..... | 15 |
| 1.2.1 | Proteasomen-basierte Polyepitop-Vakzine..... | 17 |
| 1.3 | <i>IN VITRO</i> DEGRADATIONSSYSTEME ZUR ANALYSE DES 26S PROTEASOMS..... | 18 |
| 1.3.1 | Substratabbau auf Grundlage des UFD-Systems | 19 |
| 1.3.2 | Das HPV16 E7-Protein als proteasomales Substrat | 20 |
| 1.3.3 | Das Protein MUC1 als proteasomales Substrat..... | 21 |
| 1.4 | ZIEL DER ARBEIT | 22 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN..... | 23 |
| 2.1 | MATERIAL | 23 |
| 2.1.1 | Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterial | 23 |
| 2.1.2 | Geräte | 24 |
| 2.1.3 | Oligonukleotide..... | 25 |
| 2.1.4 | Vektoren..... | 25 |
| 2.1.5 | Kits | 26 |
| 2.1.6 | Enzyme..... | 26 |
| 2.1.7 | Antikörper | 26 |
| 2.1.8 | <i>E. coli</i> -Stämme..... | 26 |
| 2.2 | METHODEN..... | 26 |
| 2.2.1 | Molekularbiologische Methoden..... | 26 |
| 2.2.1.1 | Amplifikation von DNA mittels PCR | 26 |
| 2.2.1.2 | DNA-Gelelektrophorese..... | 28 |
| 2.2.1.3 | Extraktion von DNA aus Agarosegelen | 28 |
| 2.2.1.4 | Restriktionsspaltung von DNA..... | 28 |
| 2.2.1.5 | Reinigung von DNA mittels Phenolextraktion..... | 28 |
| 2.2.1.6 | Ethanol-fällung von DNA..... | 28 |
| 2.2.1.7 | Ligation von DNA-Fragmenten..... | 28 |
| 2.2.1.8 | Herstellen kompetenter <i>E. coli</i> DH5 α -Zellen | 28 |
| 2.2.1.9 | Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA | 29 |
| 2.2.1.10 | Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> | 29 |
| 2.2.1.11 | Bestimmung der DNA-Konzentration..... | 29 |
| 2.2.1.12 | DNA-Sequenzierung | 29 |
| 2.2.2 | Rekombinante Generierung penta-ubiquitinerter Modellsubstrate | 30 |
| 2.2.2.1 | Generierung des E2-Enzyms E2-25K..... | 30 |
| 2.2.2.2 | Generierung von His-markierten Ub-Substrat-Fusionsproteinen | 30 |
| 2.2.2.3 | Generierung von Tetra-Ubiquitin | 31 |
| 2.2.2.4 | Konjugation der Fusionsproteine mit Tetra-Ubiquitin | 32 |
| 2.2.3 | Isolierung von Proteinkomplexen aus Erythrozyten | 33 |
| 2.2.3.1 | Isolierung von 26S Proteasomen | 33 |
| 2.2.3.2 | Isolierung von 20S Proteasomen | 34 |
| 2.2.3.3 | Isolierung von Fraktion II..... | 34 |
| 2.2.3.4 | Isolierung von PA28..... | 35 |
| 2.2.3.5 | Rekonstitution von 20S-PA28-Komplexen bzw. Hybridproteasomen | 35 |
| 2.2.3.6 | Isolierung des COP9-Signalsoms (CSN)..... | 35 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 2.2.4 | Proteinanalyse | 35 |
| 2.2.4.1 | Bestimmung der Proteinkonzentration | 35 |
| 2.2.4.2 | Ethanol-fällung von Proteinen | 35 |
| 2.2.4.3 | SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) | 36 |
| 2.2.4.4 | Nativ-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und fluorogener Peptid-overlay | 36 |
| 2.2.4.5 | Western Blot | 37 |
| 2.2.4.6 | Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen | 37 |
| 2.2.4.7 | Densitometrische Auswertung Coomassie-gefärbter Polyacrylamidgele | 37 |
| 2.2.4.8 | Aktivitätstest mittels fluorogener Peptide | 37 |
| 2.2.4.9 | <i>In vitro</i> Degradation von ubiquitinierten Modellsubstraten durch das Proteasom | 38 |
| 2.2.4.10 | Massenspektrometrische Analyse der Prozessierungsprodukte | 38 |
| 2.2.4.11 | Analyse des Substrateinflusses auf die peptidspaltende Aktivität des 26S Proteasoms | 39 |
| 2.2.4.12 | Interaktionsstudien mittels Glycerolgradienten-Zentrifugation | 39 |
| 2.2.4.13 | Elektronenmikroskopische Analyse | 39 |
| 2.2.5 | Zellkultur | 39 |
| 2.2.5.1 | Kultivierung von COS-7-Zellen | 40 |
| 2.2.5.2 | Einfrieren und Auftauen von COS-7-Zellen | 40 |
| 2.2.5.3 | Zelltransfektion mittels FuGENE6 | 40 |
| 2.2.5.4 | Zelllyse | 40 |
| 3 | ERGEBNISSE | 41 |
| 3.1 | DAS UFD-BASIERTE <i>IN VITRO</i> DEGRADATIONSSYSTEM ZUR ANALYSE DES 26S PROTEASOMS | 41 |
| 3.1.1 | <i>In vitro</i> Generierung von Tetra-Ubiquitin und Ub ₅ V76-E7 | 41 |
| 3.1.2 | Struktur- und Funktionsanalyse der isolierten 26S und 20S Proteasomen | 43 |
| 3.1.3 | Das Substrat Ub ₅ V76-E7 und dessen proteasomale Prozessierung <i>in vitro</i> | 44 |
| 3.1.4 | Prozessierung der Fusionsproteine UbV76-E7 und UbG76-E7 im Zellmodell | 43 |
| 3.1.5 | Das Substrat Ub ₅ G76-E7 und dessen proteasomale Prozessierung <i>in vitro</i> | 47 |
| 3.1.6 | Das Substrat Ub ₅ -MUC ₄ und dessen proteasomale Prozessierung <i>in vitro</i> | 50 |
| 3.1.7 | Die Substrate Ub ₅ -MUC ₈ und Ub ₅ -MUC _{long} und deren proteasomale Prozessierung <i>in vitro</i> | 55 |
| 3.2 | VERGLEICHENDE ANALYSE DER PROZESSIERUNG DER PENTA-UBIQUITINIERTEN MUCIN1-DERIVATE | 58 |
| 3.3 | DER EINFLUSS DER PENTA-UBIQUITINIERTEN E7- BZW. MUCIN1-SUBSTRATE AUF DIE PEPTIDSPALTENDE AKTIVITÄT DES 26S PROTEASOMS | 60 |
| 3.3.1 | Einfluss des MUC1-Anteils der Substrate auf die Proteasomaktivität | 63 |
| 3.3.2 | Kinetik des proteasomstimulierenden Effektes durch Ub ₅ -MUC ₄ | 64 |
| 3.3.3 | Effekt von Substratbindung und Deubiquitinierung auf die substratinduzierte Proteasomstimulierung | 66 |
| 3.3.4 | Effekt von ATP-Bindung bzw. Hydrolyse auf die substratvermittelte Proteasomstimulierung | 68 |
| 3.3.5 | Beitrag der drei proteasomalen Hauptaktivitäten an der substratinduzierten Proteasomstimulierung | 69 |
| 3.4 | DER EFFEKT VON PA28 AUF DIE PROTEASOMALE PROZESSIERUNG VON Ub ₅ -MUC ₄ | 70 |
| 3.5 | DIE ROLLE DER UNTEREINHEIT BETA5 BEI DER PROTEASOMALEN PROZESSIERUNG UBIQUITINIRTER MUC1-DERIVATE | 74 |
| 3.6 | DER EINFLUSS DES SUBSTRATUMSATZES AUF DIE PROTEASOMSTABILITÄT | 78 |
| 4 | DISKUSSION | 80 |
| 4.1 | DAS UFD-BASIERTE <i>IN VITRO</i> SYSTEM ZUR ANALYSE DER 26S PROTEASOMALEN PROZESSIERUNG UBIQUITINIRTER MODELLSUBSTRATE | 80 |
| 4.1.1 | Das penta-ubiquitinierte HPV16 E7-Protein | 80 |
| 4.1.2 | Penta-ubiquitinierte Mucin1-Derivate | 82 |
| 4.2 | DER SUBSTRATINDUZIERTE <i>GATING</i> -EFFEKT | 84 |
| 4.3 | DAS ZUSAMMENSPIEL VON PA28 UND 26S PROTEASOMEN | 88 |
| 4.4 | DIE ROLLE DER PROTEASOMALEN UNTEREINHEIT BETA5 BEI DER SUBSTRATPROTEOLYSE | 90 |
| 4.5 | DIE DESTABILISIERUNG DES 26S-KOMPLEXES DURCH SUBSTRATPROZESSIERUNG | 93 |
| 4.6 | DIE REGULIERUNG DES REGULATORS – EIN MODELL ZU DEN DEPENDENZEN ZWISCHEN SUBSTRAT UND PROTEASOM | 94 |
| 4.7 | DAS UFD-BASIERTE <i>IN VITRO</i> DEGRADATIONSSYSTEM – VON DEN GRUNDLAGEN ZUR ANWENDUNG | 95 |
| 5 | LITERATUR | 97 |
| | ANHANG | 107 |

ZUSAMMENFASSUNG

Das Ubiquitin-Proteasom-System gewährleistet in eukaryontischen Zellen den regulierten Abbau der meisten cytosolischen und nukleären Proteine. Es stellt die selektive Proteolyse von zellulären Schlüsselfaktoren für die Zellteilung sicher und ist mit der Generierung von T-Zell-Epitopen grundlegend an der Immunantwort beteiligt. Die Komplexität des Systems hat die Etablierung eines funktionellen *in vitro* Ansatzes zur Analyse des 26S Proteasoms erschwert, so dass eine systematische Charakterisierung der einzelnen 26S proteasomalen Prozessierungsschritte und der zwischen ihnen bestehenden Abhängigkeiten bisher nicht möglich war. Erst das von Thrower *et al.* im Jahr 2000 publizierte Verfahren der *in vitro* Generierung und Degradation von penta-ubiquitinierten Dihydrofolat-Reduktase offerierte einen methodischen Ansatz, der sich zur detaillierten Untersuchung der 26S proteasomalen Prozessierung ubiquitinierten Proteinsubstrate eignet.

In der vorliegenden Arbeit gelang es, die von Thrower *et al.* vorgestellte UFD-basierte Methode hinsichtlich einer größeren Proteinquantität zu optimieren und auf die *in vitro* Ubiquitinierung von Proteinen anzuwenden, die immunologisch von besonderem Interesse sind und auch *in vivo* ubiquitin- und proteasomabhängig degradiert werden. Eine effiziente *in vitro* Degradation durch isoliertes 26S Proteasom war für penta-ubiquitinierte Derivate des tumorassoziierten Glykoproteins Mucin1, aber nicht für das analog gewonnene E7-Protein des Humanen Papillomvirus Typ16 nachzuweisen.

Die biochemische und massenspektrometrische Analyse der Degradationsexperimente mit den ubiquitinierten Mucin1-Derivaten zeigte erstens, dass die Prozessierung der Substrate zu einem *gating*-Effekt führt, der sich in der Verdopplung der peptidspaltenden Aktivität des 26S Proteasoms widerspiegelt. Der Effekt korreliert mit der Affinität des Substrates zum 26S Proteasom und erfolgt in Abhängigkeit von Deubiquitinierung und ATP-Hydrolyse. Dies ist ein Hinweis auf eine Kopplung der genannten Prozesse, die vermutlich durch Konformationsänderungen im ATPase-Ring des 19S Regulators ein Öffnen der 20S *core*-Komponente bewirkt. Zweitens ließ sich als Folge der Substratprozessierung eine Instabilisierung des 26S Proteasoms beobachten. Diese führt zur Freisetzung von 19S-Komplexen und deutet auf einen Mechanismus hin, über den die zelluläre Proteasomenpopulation und damit die Quantität und Qualität der Proteinprozessierung reguliert werden könnte. Drittens ergab die Untersuchung zum Einfluss des Proteasom-Aktivators PA28 auf die 26S proteasomale Prozessierung des aus einem Polyepitop bestehenden MUC1-Derivates, dass PA28 eine erhöhte Quantität an proteasomal generiertem MUC1-Epitop verursacht. Dieser Befund stimmt mit dem für PA28 *in vivo* ermittelten Effekt überein, die proteasomale Generierung bestimmter T-Zell-Epitope zu verstärken. Viertens war unter Zuhilfenahme des Inhibitors clasto-Lactacystin und anhand der ubiquitinierten Mucin1-Derivate erstmals für ubiquitinierte Substrate nachweisbar, dass die proteasomale katalytische Untereinheit $\beta 5$ für die Proteindegradation durch den 26S-Komplex nicht essentiell ist. Die $\beta 5$ kennzeichnende Fähigkeit, nach hydrophoben Aminosäuren zu spalten, ließ sich auch für die Untereinheiten $\beta 1$ bzw. $\beta 2$ ermitteln und ist damit als redundant zu interpretieren.

Das in der vorliegenden Arbeit etablierte *in vitro* Abbausystem hat neben der Funktion der Proteasom-Charakterisierung auch sein Potential unter Beweis gestellt, als Testsystem zu fungieren, um *in vitro* und unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen sowohl die Wirksamkeit von Proteasom-Inhibitoren als auch die 26S proteasomale Prozessierbarkeit peptidbasierter Polyepitop-Vakzine zu bewerten.

1 EINLEITUNG

1.1 DAS UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEM

Die Abundanz eines jeden Proteins in der Zelle wird durch die Regulierung von dessen Synthese und Abbau bestimmt. Dabei gewährleistet die Proteindegradation zum einen, dass dem zellulären System falschgefaltete und nicht mehr benötigte Proteine entzogen werden. Zum anderen entstehen durch Proteolyse auch Produkte, die für die Zellhomöostase und im Fall der Vertebraten auch für die Immunabwehr essentiell sind. Freigesetzte Aminosäuren dienen dabei sowohl als Bausteine für die Proteinsynthese, als auch der Gewinnung metabolischer Energie bei Nährstoffmangel. Daneben ist die proteolytische Generierung von Peptiden ein wesentlicher Bestandteil der zellvermittelten Immunantwort. Bei dieser werden durch intrazellulären Proteinabbau entstandene Fragmente an MHC-Moleküle gebunden und an der Zelloberfläche zirkulierenden T-Lymphocyten präsentiert.

Das Ubiquitin-Proteasom-System (kurz: UPS) übernimmt im Nukleus wie auch im Cytosol aller eukaryontischen Zellen die regulierte Degradation der meisten intrazellulären Proteine (Coux *et al.*, 1996). Dieses System ist für die Zellregulierung notwendig, da es die kontrollierte Proteolyse zellulärer Schlüsselfaktoren sicherstellt, die u.a. die folgenden biologischen Prozesse steuern: Zell-Zyklus, Differenzierung, Stressantwort, neuronale Morphogenese, Sekretion, DNA-Reparatur, Transkriptionsregulation, Immunantwort und Biogenese von Organellen. Der kontrollierte und selektive Proteinabbau erfordert eine stringente Regulation des UPS, die sowohl die Substratauswahl durch Markierung mit Ubiquitin als auch die Substratprozessierung und Produktgenerierung durch den proteolytisch aktiven Proteasomkomplex betrifft.

1.1.1 Substratauswahl

1.1.1.1 Ubiquitinierung zur Markierung

Die Markierung eines potentiellen proteasomalen Substrates erfolgt in der Regel durch Übertragung einer Ubiquitinkette auf das Proteinsubstrat. Sie ist das Resultat einer enzymatischen Reaktionsfolge, bei der zunächst Ubiquitin (kurz: Ub) durch ein Ub-aktivierendes E1-Enzym gebunden wird (Abb. 1). Die Ausbildung einer Thioester-Bindung zwischen dem E1-Enzym und dem Carboxyterminus des Ub (G76) unter ATP-Verbrauch führt zur Aktivierung des Ub und seinem Transfer auf eines der zahlreichen Ub-konjugierenden Enzyme E2. Die finale Übertragung des Ub auf das Substrat wird durch eine substratspezifische E3 Ub-Ligase vermittelt. E2-Enzyme assoziieren mit E3-Enzymen, die für sie spezifischen Substrate bereits gebunden haben können. Ub-Ligasen, die zur großen Gruppe der HECT-Domänen E3s (*homologous to E6-AP carboxyl terminus*) gehören, übernehmen Ub zunächst über das Cystein des aktiven Zentrums der HECT-Domäne, bevor es auf das Substrat oder eine bereits am Substrat gebundene Ub-Kette übertragen wird. Im Falle der E3s der RING-Gruppe (RING-Finger) wird Ub direkt vom E2 an das Substrat weitergeleitet.

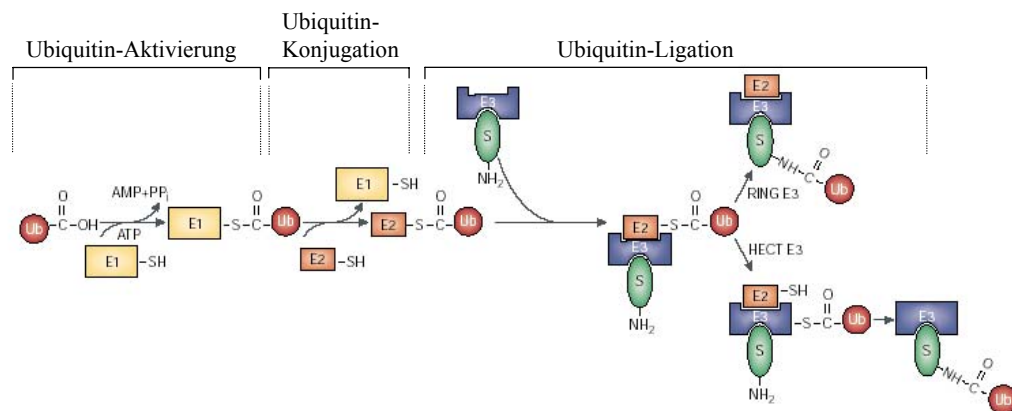


Abb. 1: Ubiquitinierungskaskade. Die Markierung von Substraten mit Ubiquitin (Darstellung in rot) bzw. Ub-Ketten erfordert eine initiale Ub-Aktivierung mittels eines E1-Enzyms (gelb), die folgende Übertragung des aktivierten Ub auf ein Ub-konjugierendes Enzym E2 (orange) und den finalen Ub-Transfer vom E2-Enzym auf das Substrat (grün) mittels einer spezifischen E3-Ligase (blau). Im Fall der RING E3-Ligasen erfolgt die Ub-Übertragung direkt von dem E2 auf das Substrat, während die HECT E3-Ligasen das Ub zunächst vom E2 übernehmen und dann an das Substrat weiterleiten. Graphik basiert auf Weissman *et al.* (Weissman, 2001).

Dabei entsteht eine Amidbindung zwischen dem Ub COOH-Terminus und einer substratinternen Aminogruppe. In der Regel handelt es sich bei dieser um die ϵ -Aminogruppe eines Lysins, so dass es zur Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen Ub und Substrat kommt (Hershko & Ciechanover, 1998). Demgegenüber wird bei den Proteinen MyoD, HPV16 E7-Protein und EBV LMP1-Protein sowie Substraten, die kein Lysin enthalten, eine Verknüpfung des Ub COOH-Terminus mit dem NH_2 -Terminus des Substrates, also mit einer α -Aminogruppe angenommen (Aviel *et al.*, 2000; Breitschopf *et al.*, 1998; Reinstein *et al.*, 2000). Im Laufe des Ubiquitinierungsprozesses werden mehrere Ub-Moleküle auf das Substrat übertragen. Es entsteht eine polymere Kette, in der die Ub-Moleküle über Isopeptidbindungen gewöhnlich zwischen der Carboxylgruppe des G76 und der ϵ -Aminogruppe des K48 verbunden sind. Der 19S Regulator des 26S Proteasoms erkennt und bindet mit hoher Affinität über eine Untereinheit oder definierte Regionen auf der Komplexoberfläche Ub-Ketten, die mindestens vier K48-G76-isopeptidisch verknüpfte Ub-Moleküle enthalten müssen (Pickart, 1997; Thrower *et al.*, 2000). Poly-Ub-Ketten, deren Monomere über die Aminosäuren K63 und G76 verbunden sind, stellen dagegen sehr wahrscheinlich kein Signal für den proteasomalen Abbau dar, sondern spielen eine Rolle für Signalkaskaden, DNA-Reparatur und möglicherweise andere Aufgaben (Hofmann & Pickart, 1999; Spence *et al.*, 2000; Spence *et al.*, 1995). Auch die Verknüpfung von Ub-Molekülen über die Bindung K11-G76 bzw. K29-G76 wurde nachgewiesen, allerdings ist deren Funktion noch unklar (Weissman, 2001).

Die Substraterkennung durch die spezifischen E3-Ligasen erfolgt über substratinterne Sequenzmotive. Ob ein Protein von einer E3-Ligase erkannt wird, hängt zum einen von den Eigenschaften der Substratsequenz und zum anderen vom „Zustand“ der E3-Ligase ab. Deren Fähigkeit, die Sequenzmotive zu binden, kann z.B. durch kovalente Modifikationen beeinträchtigt sein. Im Folgenden sind die wichtigsten Erkennungssignale aufgeführt:

- Beim Mechanismus der „*N-end rule*“ wird das Substrat anhand seiner NH₂-terminalen Aminosäure erkannt, welche damit zur Destabilisierung des Substrates beiträgt. Insbesondere die Aminosäuren Arginin und Lysin bzw. Phenylalanin und Tryptophan gelten als destabilisierend (Bachmair *et al.*, 1986; Varshavsky, 1996).
- Die Substraterkennung kann eine Phosphorylierung der Erkennungssequenz erfordern, z.B. beim CDK Inhibitor p27^{Kip1} und dem Transkriptionsregulator IκBα. Viele kurzlebige Proteine besitzen eine Sequenz, in der sich die Aminosäuren Prolin, Glutamat, Serin und Threonin (kurz: PEST) häufen und deren destabilisierender Charakter mit der Phosphorylierung der Ser/Thr-Reste begründet wird (Rogers *et al.*, 1986). Die Modifikation durch Phosphorylierung kann in anderen Fällen auch den Abbau hemmen. Die Aktivität des in Hefe vorkommenden APC/Cyclosome RING-E3-Komplexes wird durch Anfügen von Phosphatgruppen an jeweils verschiedenen Untereinheiten des Komplexes stimuliert bzw. reduziert. Auch die Phosphorylierung des Protoonkogen-Produktes c-Mos an Ser3 beeinträchtigt den Substrat-Ligase-Kontakt und verhindert damit den eigenen Abbau (Nishizawa *et al.*, 1993; Nishizawa *et al.*, 1992).
- In einigen Fällen wird das Zielprotein nicht direkt durch die E3-Ligase, sondern mit Hilfe zusätzlicher Faktoren erkannt; z.B. benötigt die HECT E3-Ligase E6-AP das HPV-Protein E6, um das Tumorsuppressorgen-Produkt p53 zu ubiquitinieren (Scheffner *et al.*, 1993).
- Proteinfehlfaltungen, die das Resultat von Mutationen oder einer fehlerhaften Maturierung sein können, führen zur Exposition hydrophober Bereiche, die als Markierungssignal fungieren. Im funktionellen Protein sind diese Regionen durch eine korrekte Faltung oder Protein-Protein Interaktionen verborgen (Hershko *et al.*, 1982).
- Des Weiteren kann die Substratbindung andere Sequenzmotive, die Regulation der E3-Ligasen durch UBL-Proteine (*Ub-like proteins*; z.B. SUMO und NEDD8) oder auch die Präsenz weiterer Faktoren erfordern (Buschmann *et al.*, 2000; Yeh *et al.*, 2000).

1.1.1.2 Deubiquitinierung zur Prozessierung oder als Korrektiv

Der Prozess der Ubiquitinierung ist reversibel. Die Spaltung der Amidbindung an der Carboxylgruppe der COOH-terminalen Aminosäure G76 zur Freisetzung von Ub-Molekülen oder Ub-Ketten wird von Deubiquitinierungsenzymen (kurz: DUB) ausgeführt, die als Ub-spezifische Hydrolasen wirken und sich nach Größe, Sequenzhomologie und Art des katalytischen Zentrums kategorisieren lassen:

- Die UCH (*Ub carboxy-terminal hydrolase*) sind Cystein-Proteasen von etwa 20-30kDa Größe und enthalten konserviert im aktiven Zentrum eine katalytische Triade, die aus Cystein, Histidin und Aspartat gebildet wird. Sie sind zur Deubiquitinierung von kurzen und flexiblen Peptiden in der Lage. Bisher ist nur von dem proteasomassoziierten Enzym UCH37 bekannt, dass es Ub distal von Ub-Ketten entfernen kann (Lam *et al.*, 1997a; Lam *et al.*, 1997b).

- Die zweite große und weniger homogene Gruppe der DUBs umfasst die UBPs (*Ub-specific processing protease*), zu denen Cystein-Proteasen von etwa 100kDa Größe zählen. Sie prozessieren Ub-Vorläufer, also natürliche lineare Fusionsproteine, aber auch synthetische Ub-Protein-Fusionen und sind auch zur Spaltung von Ub-Ketten mit isopeptidischer Verknüpfung in der Lage. Das proteasomassoziierte Protein Ubp6/USP14 gilt als ein Vertreter dieser Gruppe (Borodovsky *et al.*, 2001; Guterman & Glickman, 2004a; Leggett *et al.*, 2002).
- Auch die DUBs, die zur OTU (*ovarian tumor*) Superfamilie von Proteinen gehören, sind Cystein-Proteasen. Ein Kennzeichen dieser Gruppe ist die Fähigkeit, Ub-Aldehyd zu binden. Des Weiteren weisen sie die für UCH typische katalytische Triade aus Cystein, Histidin und Aspartat auf, zeigen aber keine Sequenzhomologie zu den UCH und UBPs (Balakirev *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2003).
- Es sind erst drei DUBs bekannt, die sich der Gruppe von Proteinen mit JAMM Motiv (*Jab-MPN domain metalloenzyme*) zuordnen lassen. Dieses Motiv bildet das aktive Zentrum oder die Ligandenbindungsstelle von metallbindenden Proteinen. Die proteasomale Deubiquitinase und 19S Untereinheit Rpn11 sowie die Untereinheit CSN5 des COP9-Signalsoms (CSN) gehören dieser Gruppe an (Groisman *et al.*, 2003; Johnston *et al.*, 1999; Verma *et al.*, 2002; Yao & Cohen, 2002). Das CSN ist ein multimerer Komplex, der intrinsisch oder durch assoziierte Proteine Kinase-, Deneddylierungs- und Deubiquitinierungsaktivitäten zeigt (Wei & Deng, 2003). Rpn11 bzw. CSN5 sind nicht mit den klassischen DUB-Inhibitoren wie z.B N-Ethylmaleimid (NEM) inhibierbar, die eine Alkylierung und damit Inaktivierung des Cysteins im aktiven Zentrum verursachen. Eine Hemmung ist dagegen mit dem Zn^{2+} -Chelator ortho-Phenanthrolin (o-PT) möglich.

DUBs haben einerseits Funktionen, die den proteasomalen Abbau unterstützen: Ub wird aus natürlichen Fusionsproteinen freigesetzt und aus nicht verankerten Ub-Ketten recycelt. Zudem ermöglichen DUBs, die Teil des 26S Proteasoms sind (Rpn11) oder assoziiert vorliegen (Ubp6/USP14, UCH37), das hoch stabile, globuläre Protein Ubiquitin vom Substrat zu entfernen, bevor es – wie das Substrat – zur Degradation in den proteolytischen Bereich des Proteasoms überführt wird. Andererseits können DUBs auch einen Substratabbau verhindern, indem insbesondere Substraten mit wenigen oder kurzen Ub-Ketten die Markierung durch Deubiquitinierung entfernt wird. Damit ergibt sich für die DUBs auch eine Korrekturfunktion: durch Rücknahme der Markierung schützen sie das Substrat vor der proteasomalen Prozessierung. Man nimmt an, dass von der Länge der Poly-Ub-Kette abhängt, ob ein Substrat bis zum Abbau am Proteasom verankert bleibt oder vorzeitig durch Deubiquitinierung wieder freigesetzt wird (Eytan *et al.*, 1993; Guterman & Glickman, 2004b; Lam *et al.*, 1997b; Thrower *et al.*, 2000). Dabei ist auch die Art der Deubiquitinierung entscheidend. Während die proximale Abspaltung der Ub-Kette, die auch als *shaving* bezeichnet wird, das Substrat komplett demarkiert und somit vor dem Abbau schützt, ist der Prozess des *trimming*, also des distalen Entfernens der einzelnen Ub-Moleküle nacheinander, dem Substratabbau zuträglich (Glickman & Adir, 2004).

1.1.2 Substratprozessierung durch das Proteasom

Substrate, die mit K48-G76-verknüpften Ub-Ketten markiert sind, weisen das proteasomale Erkennungssignal auf und binden über dieses an das 26S Proteasom. Die Substratübertragung auf das Proteasom kann direkt oder mittels Faktoren erfolgen, die über ubiquitin- und proteasombindende Eigenschaften verfügen. Diese Fähigkeit ist z.B. für die UBA/UBL-Proteine hHR23a/b und Dsk2 gezeigt worden, die eine UBA-Region (*Ub-associated domain*) und UBL-Domäne (*Ub-like*) enthalten und über diese den Transfer ubiquitinierten Substrate auf die Ub-Bindungsstellen des 26S-Komplexes vermitteln können (Chen *et al.*, 2001; Funakoshi *et al.*, 2002; Wilkinson *et al.*, 2001). An die Substratbindung schließen sich proteasomale Prozessierungsschritte an. Das 26S Proteasom ist etwa 2,5MDa groß und besteht aus zwei Subkomplexen: Der zylinderförmige 20S *core*-Partikel ist die proteolytisch aktive Komponente, an die ein bzw. zwei 19S Regulatoren assoziieren können. Diese ermöglichen die Substratbindung, -deubiquitinierung, -entfaltung und -translokation und führen das Substrat dem 20S *core*-Partikel und damit der Degradation zu. In der Zelle existieren neben dem 26S Proteasom auch freie 20S *core*-Partikel, die – dem dualen Proteasomenmodell zufolge – zur weiteren Prozessierung von 26S proteasomalen Produkten beitragen können (Kloetzel, 2004). Daneben ist möglich, dass die freien 20S Proteasomen zu Beginn bestimmter Stress-Situationen, wie z.B. einer durch Infektion eingeleiteten Immunantwort, eine schnelle Reaktion erlauben, indem sie unmittelbar für die Bildung immunologisch relevanter Komplexe wie einem mit PA28 assoziierten 20S Proteasom bzw. einem Hybridkomplex zur Verfügung stehen (Kapitel 1.1.2.3).

1.1.2.1 Das 20S Proteasom – der proteolytische *core*-Partikel

Die Röntgenstruktur-Analyse des 20S *core*-Partikels aus *S. cerevisiae* weist für diesen eine zylindrische Struktur aus, die durch die stapelähnliche Anordnung von vier heptameren Ringen zustande kommt (Groll *et al.*, 1997). Die äußeren Ringe enthalten sieben α -Untereinheiten, die beiden inneren sieben β -Untereinheiten ($\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$). Dieser Aufbau erzeugt quer zur Zylinderachse eine C2-Symmetrie, längs der Zylinderachse eine Pseudo-Siebenfach-Symmetrie (Abb. 2A). Die α - und β -Untereinheiten zeigen trotz Unterschieden in der Primärsequenz eine ähnliche und charakteristische Faltung, die aufgrund der schichtartigen Anordnung zweier fünfsträngiger antiparalleler β -Faltblätter und helikaler Lagen eine Sandwichform erzeugt. Der *core*-Partikel hat einen Durchmesser von 11nm und beherbergt einen 15nm langen Tunnel, der auf Ebene der α -Ringe und β -Ringe Verengungen aufweist. Diese führen zur Separierung des Tunnels in drei große innere Hohlräume: die zentrale proteolytische Kammer und die beiden Vorkammern (Abb. 2B). Während die β -Ringe das proteolytische Zentrum bilden, vermitteln die α -Ringe den regulierten Substratzustrom in den katalytischen Bereich.

In Eukaryonten haben jeweils drei der sieben β -Untereinheiten eine katalytische Aktivität inne, die von dem Thr1O (Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe des Threonin1) ausgeht. Dieses ist als Nukleophil wirksam und weist den Proteasomkomplex als Ntn-Hydrolase (*N-terminal nucleophilic hydrolase*) aus. Damit verfügt das Proteasom je β -Ring über drei verschiedene proteolytisch aktive

Zentren, die in den durch die β -Ringe ausgebildeten proteasomalen Hohlbereich ausgerichtet sind (Abb. 2B).

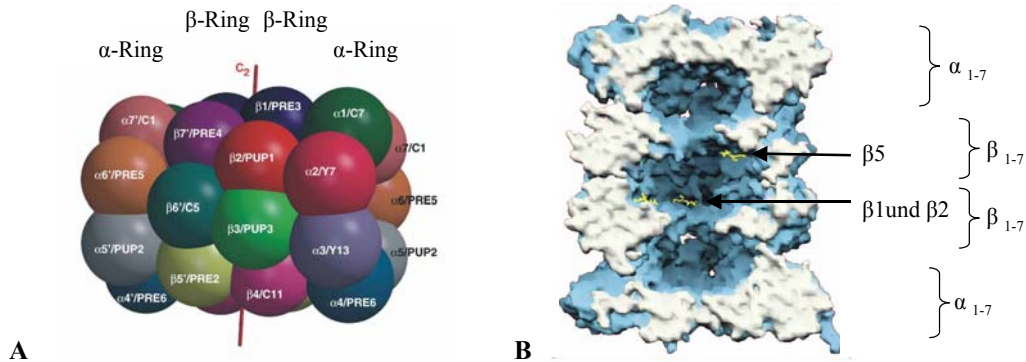


Abb. 2: Topologie des 20S core-Partikels. (A) Das Kugelmodell eines 20S Proteasoms, das aus den Daten der Röntgenstruktur-Analyse zum 20S Proteasom aus *S. cerevisiae* abgeleitet wurde, macht die Zylinderform des Partikels anschaulich, die durch die dargestellte Anlagerung von jeweils zwei Ringen aus sieben α - bzw. β -Untereinheiten zustande kommt. (B) Der vertikale Schnitt durch die Kristallstruktur des 20S Proteasoms verdeutlicht die Präsenz zweier Vorkammern und eines zentralen proteolytischen Hohlraums, in den die katalytischen Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ (Darstellung in gelb) hineinragen. Die Abbildungen stammen aus Groll *et al.* (Groll *et al.*, 1997; Groll *et al.*, 1999).

Das katalytische System der aktiven β -Untereinheiten umfasst die Aminosäuren Thr1, Glu17 und Lys33. Die Aminosäure an Position 45 formt den Boden der S1-Tasche, beeinflusst deren chemischen Charakter und damit die Art der dort bindenden Substratbereiche. Die Untereinheit $\beta 1$ enthält ein Arginin an dieser Stelle und vermittelt die nach sauren Resten spaltende Aktivität PGPH bzw. Caspase-ähnlich (Dick *et al.*, 1998; Hilt & Wolf, 1996). Die Untereinheit $\beta 2$ weist ein Gly45 auf und ist so zur Bindung auch großer Aminosäuren an Position P1 in der Lage. Die Sequenzumgebung scheint für die von $\beta 2$ präferierte Trypsin-ähnliche (T-L) Aktivität verantwortlich zu sein (Groll *et al.*, 1999; Heinemeyer *et al.*, 1997; Jager *et al.*, 1999). Für die Untereinheit $\beta 5$ wurde an Position 45 ein Methionin ermittelt. Des Weiteren ließ sich für diese Untereinheit eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (ChT-L) sowie eine Tendenz feststellen, nach kleinen neutralen Aminosäuren (SNAAP-Aktivität) und nach solchen mit verzweigten Seitenketten (BrAAP-Aktivität) zu spalten (Dick *et al.*, 1998; Orlowski *et al.*, 1993). Die so vorgenommenen Zuordnungen gründen sich auf Mutationsanalysen in *S. cerevisiae*. Sie gelten aber nicht strikt, sondern geben nur die für die katalytischen β -Untereinheiten ermittelten Spaltpräferenzen wieder.

Beta5 scheint unter den katalytischen Untereinheiten eine Sonderrolle einzunehmen. In *S. cerevisiae* war es nicht möglich, Mutanten zu gewinnen, die einen T1A Austausch in $\beta 5$ aufweisen. Dagegen gelang die Isolierung von T1A-Mutanten für die Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 2$. Die essentielle Bedeutung von $\beta 5$ konnte auf dessen proteolytische Aktivität und auch auf die chaperonähnliche Funktion des $\beta 5$ -Propeptids bei der Proteasomassemblierung zurückgeführt werden (Chen & Hochstrasser, 1996; Heinemeyer *et al.*, 1997; Jager *et al.*, 1999). Im System der Mammalia hat $\beta 5$ als Proform im Vergleich zu $\beta 1$ und $\beta 2$ den stärksten Einfluss auf die Proteasomassemblierung, welche mit der von prozessiertem $\beta 5$ ausgeführten Degradation des Maturierungsfaktors Pomp abschließt (Heink *et al.*,

2005; Kruger *et al.*, 2001; Schmidtke *et al.*, 1997). Auch für die Spaltung von Peptid- und Proteinsubstraten im reifen, funktionellen Proteasom wurde $\beta 5$ als Hauptaktivität angesehen, da die Inhibition der $\beta 5$ -vermittelten Aktivität zu einem deutlich reduzierten Abbau bestimmter Proteine und einer beeinträchtigten Präsentation von MHC Klasse I-restringierten Epitopen führte (Rock *et al.*, 1994).

Der 20S *core*-Partikel ist nur zum Abbau bereits entfalteter Polypeptide in der Lage. Deren Degradation durch das 20S Proteasom erfolgt vorwiegend prozessiv. Allerdings konnte *in vitro* für die zum Teil ungefaltet vorliegenden Proteine GAP-43, Tau, α -Synuclein und p21 auch die Bildung und Freisetzung von Intermediaten nachgewiesen werden (Cardozo & Michaud, 2002; Denny, 2004; Liu *et al.*, 2003). Der Mechanismus der Prozessierung wurde zunächst mit dem Modell des *bite and chew* erklärt, nach welchem während des Substratabbaus eine allosterische Aktivierung bzw. Inaktivierung der katalytischen β -Untereinheiten stattfindet. Der für $\beta 5$ postulierte initiale Schnitt (*bite*) hat in diesem Modell eine Aktivierung der PGPH-Aktivität zur Folge (*chew*), die sich wiederum hemmend auf die von $\beta 5$ vermittelte ChT-L Aktivität auswirkt (Kisselev *et al.*, 1999a). Diesem Modell stehen Daten gegenüber, die die Existenz von sogenannten *modifier sites* vorschlagen. Demnach beeinflusst die Bindung von hydrophoben Substraten an diese postulierten, nicht katalytischen Bereiche die Proteasomaktivität (Kisselev *et al.*, 2002; Schmidtke *et al.*, 2000). Kisselev *et al.* schlagen vor, dass dieses Phänomen auf einen *gating*-Effekt zurückgeht, also die Bindung von bestimmten Peptiden an die *modifier sites* zu einer Konformationsänderung in den α -Untereinheiten und damit zu einer stimulierten Peptidaseaktivität führt. Auch Untersuchungen mit dem Protease-Inhibitor Ritonavir weisen auf eine funktionelle Interdependenz zwischen den proteasomalen Untereinheiten hin (Gaedicke *et al.*, 2002; Schmidtke *et al.*, 1999).

Die Länge der vom 20S *core*-Partikel generierten Produkte variiert zwischen 3-25 Aminosäuren, wobei die meisten Fragmente eine Länge von 7-8 Aminosäuren aufweisen. *In vitro* Abbaupexperimente mit dem thermolabilen Substrat Enolase haben für das Hefe 20S Proteasom gezeigt, dass die Anzahl aktiver katalytischer Untereinheiten weder für die Umsatzrate noch für die Produktlänge entscheidend ist und sich nur in einem veränderten Schnittmuster widerspiegelt (Nussbaum *et al.*, 1998). Auch die kovalente Bindung spezifischer Inhibitoren an das Thr10 der jeweiligen katalytischen Untereinheiten hat keine Beeinflussung der nicht betroffenen aktiven Gruppen ergeben und keine Hinweise auf signifikante strukturelle Veränderungen erbracht (Groll *et al.*, 1997; Groll *et al.*, 2001; Groll *et al.*, 2002).

Die strukturelle Organisation des eukaryontischen Proteasoms ermöglicht einen kontrollierten Zugang der zellulären Komponenten an die ins Innere des Partikels weisenden Thr10-Reste der proteolytisch aktiven β -Untereinheiten. Die den Partikel abschließenden α -Ringe verhindern mit ihren in die Ringmitte gerichteten NH_2 -Termini den unkontrollierten Substrateinstrom in den katalytischen Bereich. Erst die Bindung von regulatorischen Komplexen, wie z.B. dem 19S Regulator und dem Proteasom-Aktivator PA28 an die α -Untereinheiten bzw. die Anlagerung hydrophober Peptide an die postulierten *modifier sites* führen zu Konformationsänderungen in dem betreffenden α -Ring und zu seiner Öffnung. Dieser Vorgang wird als *gating* bezeichnet. Die Untereinheit $\alpha 3$ nimmt dabei eine

Sonderstellung ein, da ihr NH₂-Terminus Kontakt zu allen anderen α -Untereinheiten des Ringes aufweist und die Deletion der ersten neun Aminosäuren in $\alpha 3$ ($\alpha 3\Delta N$) eine konstitutive Aktivierung des 20S *core*-Partikels in *S. cerevisiae* zur Folge hat (Abb. 3B) (Groll *et al.*, 2000). Von besonderer Bedeutung für die Interaktion scheint die zwischen Asp7 in $\alpha 3$ und Tyr4 bzw. Arg6 in $\alpha 4$ ausgebildete Salzbrücke zu sein, wobei dieses YDR-Motiv auch in anderen α -Untereinheiten vorkommt und daher als ein Schlüsselement für die α -Ring Struktur gilt (Abb. 3A).

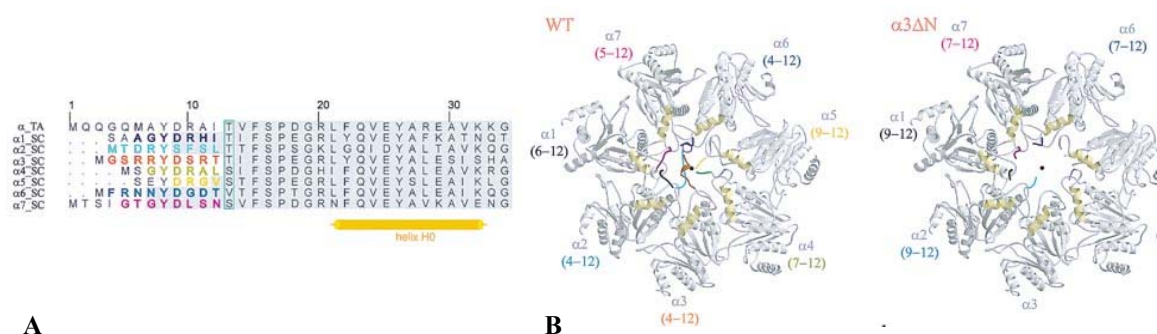


Abb. 3: Die Rolle der NH₂-terminalen Bereiche der α -Untereinheiten beim gating. (A) Der Sequenzvergleich der NH₂-Termini der α -Untereinheiten aus *T. acidophilum* und *S. cerevisiae* zeigt das konservierte Auftreten eines YDR-Motivs an Position 8-10. (B) Es ist das *ribbon drawing*-Modell zum α -Ring des Wildtyp-Proteasoms aus *S. cerevisiae* bzw. der Mutante $\alpha 3\Delta N$ dargestellt, deren $\alpha 3$ -Untereinheit eine Deletion der ersten neun Aminosäuren aufweist. Die $\alpha 3\Delta N$ Mutante zeigt eine deutliche Öffnung des α -Ringes und wird als *open gate*-Mutante bezeichnet. Die Abbildungen stammen aus Groll *et al.* (Groll *et al.*, 2000).

1.1.2.2 Das 26S Proteasom – die Funktion des 19S Regulators (PA700)

Die Assoziation des 19S Regulators (kurz: RP, *regulatory particle*) an die α -Ringe des 20S *core*-Partikels (kurz: CP) führt zur Bildung des 26S Holoenzym mit einem 19S-Komplex (RP₁CP) oder zweien (RP₂CP) (Abb. 4). Sie erfolgt in Abhängigkeit von ATP und verursacht eine Stimulierung der peptidspaltenden Aktivität des Proteasoms, die im Fall von RP₁CP dem Dreifachen und von RP₂CP dem Sechs- bis Zehnfachen der Grundaktivität entsprechen kann (Adams *et al.*, 1998; Chu-Ping *et al.*, 1994; Dahlmann *et al.*, 1995; Eytan *et al.*, 1989; Kopp *et al.*, 2001). Neben diesem *gating*-Effekt ist für den 19S Regulator die Bindung polyubiquitinerter Substrate und deren Prozessierung beschrieben. Letztere beinhaltet die Deubiquitinierung, Denaturierung und die Translokation des Substrates in den proteolytischen Bereich des 20S *core*-Partikels. Die Untereinheiten-Zusammensetzung des 19S Regulators ist bei verschiedenen Spezies ähnlich (DeMartino *et al.*, 1994; Dubiel *et al.*, 1995; Finley *et al.*, 1998; Holzl *et al.*, 2000). Der Regulator umfasst mindestens 18 unterschiedliche Proteine, die sich nach Struktur und Funktion den 19S Subkomplexen *base* und *lid* zuordnen lassen und einen Gesamtkomplex von etwa 1MDa Größe bilden (Abb. 4B). Die Daten zur Struktur basieren auf Interaktionsstudien und elektronenmikroskopischen Aufnahmen isolierter 26S-Komplexe sowie der Kristallstruktur von 20S Proteasomen aus verschiedenen Spezies (Abb. 4A).

Eine Röntgenstruktur des Komplexes gibt es bisher nicht, da eine Kristallisierung des Holoenzym noch nicht gelungen ist. Ursache dafür sind sehr wahrscheinlich die Instabilität des 26S Proteasoms sowie die konformationelle Flexibilität innerhalb des 19S Regulators (Walz *et al.*, 1998).

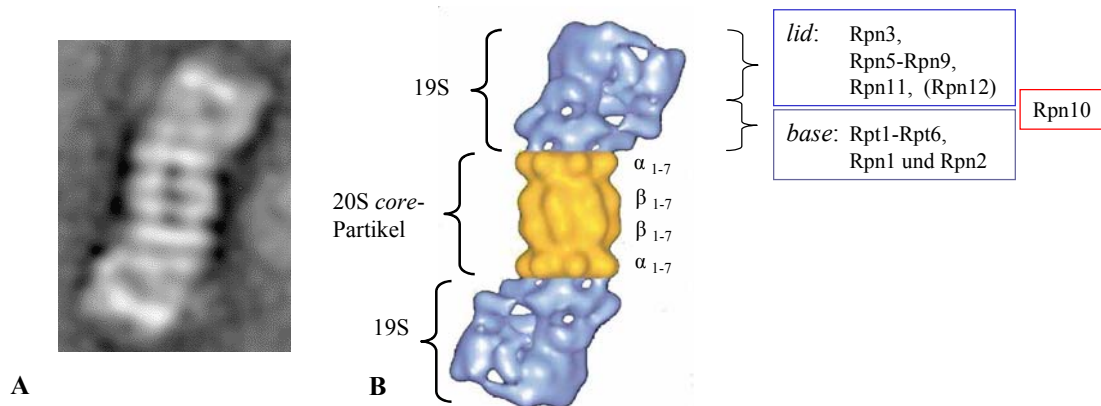


Abb. 4: Die Struktur des 26S Proteasoms. (A) Die elektronenmikroskopische Aufnahme (*negative stain*) eines 26S Proteasoms aus *S. cerevisiae* zeigt dessen Aufbau aus einem 20S *core*-Partikel und zwei angrenzenden 19S Regulatoren (Glickman *et al.*, 1998a). (B) Die 3D-Rekonstruktion eines 26S Proteasoms leitet sich aus der Kristallstruktur des 20S Proteasoms von *T. acidophilum* und elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu 26S Proteasomen aus *Drosophila spec.* ab (Walz *et al.*, 1998). Sie bestätigt den in (A) dargestellten Komplexaufbau und lässt die 19S Subkomplexe *lid* und *base* erkennen.

Der Subkomplex *base* besteht aus zwei Nicht-ATPase-Untereinheiten (Rpn1 und Rpn2), die vermutlich über KEKE- und Leucin-reiche Regionen (LRR-Regionen) zur Strukturbildung beitragen, und sechs ATPase-Untereinheiten (Rpt1-Rpt6) (Abb. 5) (Ferrell *et al.*, 2000). Diese zählen zur Familie der TripleA-ATPasen (*ATPas*es *associated with various cellular activities*). Die Untereinheiten Rpt1-6 enthalten einen NH₂-terminalen Nicht-ATPase-Bereich, welcher über *coiled-coil*-Domänen vermutlich der Substraterkennung und der Positionierung der ATPasen im 19S Regulator dient (Gorbea *et al.*, 1999). Der zentrale Bereich der Untereinheiten umfasst eine etwa 200 Aminosäure lange AAA-ATPase Domäne, die neben dem Walker A und B Motiv zur ATP-Bindung ein charakteristisches Element aufweist, das mit SHR (*second region of homology*) bezeichnet wird (Gorbea *et al.*, 1999; Lupas *et al.*, 1997; Lupas & Martin, 2002; Walker *et al.*, 1982). Deutliche Sequenzunterschiede sowohl in den nukleotidbindenden als auch in den Nicht-ATPase-Regionen der proteasomalen ATPasen und Mutationsanalysen zu diesen in *S. cerevisiae* deuten darauf hin, dass die sechs Rpt-Untereinheiten verschiedene Funktionen haben (Rubin *et al.*, 1998). Die Untereinheit Rpt5 ist zur Bindung von Poly-Ub-Ketten in der Lage und gilt daher als eine potentielle proteasomale Bindungsstelle für ubiquitinierte Substrate (Deveraux *et al.*, 1994; Lam *et al.*, 2002). Daneben konnte für die ATPase Rpt2 gezeigt werden, dass sie für den *gating*-Effekt am 20S *core*-Partikel essentiell ist (Kohler *et al.*, 2001).

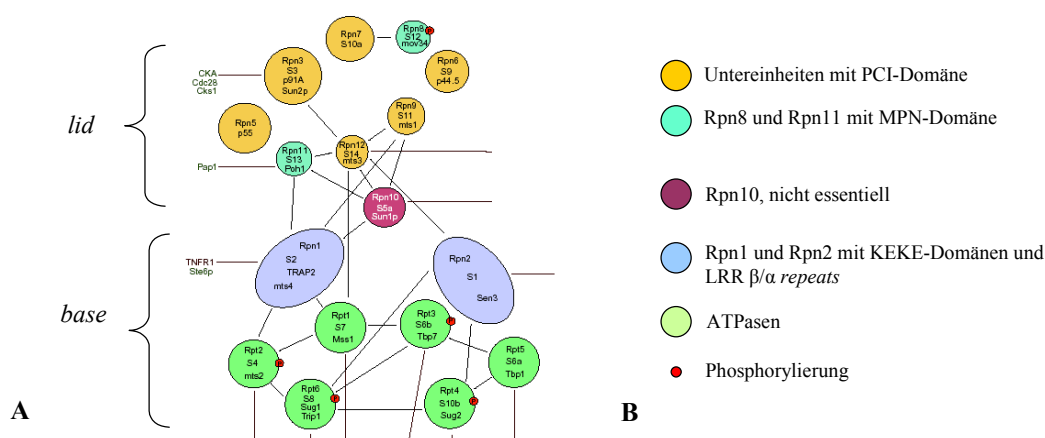


Abb. 5: Aufbau der 19S Subkomplexe *lid* und *base*. (A) Interaktionsstudien im Hefesystem haben die dargestellte Anordnung der 19S Untereinheiten ergeben (Ferrell *et al.*, 2000). Die sechs ATPasen (hellgrün) bilden als Ring die Basis des *base*-Komplexes und interagieren mit dem 20S Proteasom. Rpn1 und Rpn2 vermitteln wahrscheinlich über KEKE-Domänen bzw. LRR-repeats die Bindung des *lid*-Komplexes. (B) Legende zu der farbigen Darstellung der 19S Untereinheiten

In Analogie zu den prokaryontischen ATP-abhängigen Proteasekomplexen ClpAP sowie HslVU und aufgrund von Interaktionsstudien wird auch für die proteasomalen ATPasen eine Anordnung in einem hexameren Ring postuliert (Abb. 5). Diese deutet auf eine Nichtübereinstimmung der Symmetrien (*symmetry mismatch*) des 20S Proteasoms (Siebenfach-Symmetrie) und des an diesem anliegenden 19S-Komplexes (Sechsfach-Symmetrie) hin (Groll *et al.*, 1997; Zwickl *et al.*, 2000). Man nimmt an, dass nicht jede Rpt-Untereinheit eine stabile Interaktion mit jeweils einer α -Untereinheit ausbildet. Da aber alle NH₂-Termini der sieben α -Untereinheiten in das Heptamer-Zentrum zeigen, könnte jede Rpt-Untereinheit theoretisch mit mehr als einer α -Untereinheit interagieren. Obwohl bisher nur für die Paarung Rpt2- α 3 eine Beteiligung am *gating* ermittelt werden konnte, gilt die Mitwirkung zusätzlicher Rpt- α Interaktionen als wahrscheinlich (Groll *et al.*, 2000; Kohler *et al.*, 2001; Rubin *et al.*, 1998). Über diese wäre eine Neuordnung der NH₂-Termini der α -Untereinheiten und die Stabilisierung der daraus resultierenden offenen Konformation denkbar.

Der *base*-Subkomplex hat neben dem *gating*-Effekt eine chaperonähnliche Funktion, die an dem Substrat Citrat-Synthase demonstriert wurde: Citrat-Synthase wurde in einem denaturierten Zustand von dem *base*-Subkomplex gebunden und gefaltet (Braun *et al.*, 1999). Diese Beobachtung stand der Erwartung gegenüber, dass die proteasomalen ATPasen für die umgekehrte Reaktion, also die Substratentfaltung zuständig sein müssten. Erst die Entfaltung erlaubt den Abbau des Substrates durch den 20S *core*-Partikel. Vermutlich kann der Subkomplex als Faltungs- oder Entfaltungsenzym wirken, je nachdem, ob er mit dem 20S *core*-Partikel komplexiert vorliegt. Eine dafür nötige Stabilisierung des Komplexes aus 20S und 19S erfolgt möglicherweise durch die Bindung der in der Regel ubiquitinierten Substrate mittels des Ubiquitin-„Ankers“ (Zwickl & Baumeister, 1999).

Die Untereinheit Rpn10 ist mit dem *base*-Subkomplex assoziiert, kann aber auch an den *lid*-Subkomplex binden oder frei vorliegen (van Nocker *et al.*, 1996). Sie scheint einen stabilisierenden Einfluss auf die Interaktionen zwischen den Subkomplexen *base* und *lid* zu haben. Des Weiteren ist speziell für den carboxyterminalen Bereich von Rpn10 eine Bindung an poly-Ub-Ketten gezeigt worden. Der COOH-Terminus enthält eine UIM (*Ub-interacting motif*) Region, über die die Bindung

und Rekrutierung von poly-ubiquitinierten Substraten an das Proteasom möglich ist. Allerdings sind noch andere Faktoren, wie z.B. UBA/UBL-Proteine zur Substratheranführung in der Lage, denn im Hefesystem ist die Rpn10-Deletionsmutante lebensfähig (Glickman *et al.*, 1998a; van Nocker *et al.*, 1996).

Der *lid*-Subkomplex besteht aus acht Untereinheiten (Rpn3, Rpn5-9, Rpn11-12), die in einer scheibenartigen Form arrangiert sind und zur Substratbindung bzw. Deubiquitinierung beitragen (Abb. 5). Die *lid*-Komponenten enthalten jeweils eines von zwei Strukturmotiven: die PCI- (Proteasom, COP9 Signalosom, Initiationsfaktor 3) bzw. die MPN-Domäne (Mpr1p/Pad1p NH₂-Terminus). Beide Motive kommen auch in dem Protein eIF3 des eukaryontischen Translations-Initiations-Komplexes sowie in Komponenten des COP9 Signalosoms (CSN) vor. Der CSN-Komplex ist an Signal-Transduktionsvorgängen beteiligt und wurde zuerst in Pflanzen entdeckt, wo er an der konstitutiven Photomorphogenese mitwirkt. Den CSN-Komplex kennzeichnen Kinase-, Deneddylierungs- bzw. Deubiquitinierungsaktivitäten, die durch intrinsische bzw. assoziierte Proteine vermittelt werden.

Die PCI-Domäne ist etwa 200 Aminosäuren lang und befindet sich als helikale Struktur an den COOH-Termini der proteasomalen *lid*-Proteine Rpn3, Rpn5-7, Rpn9 und Rpn12. Die Domäne ist bisher ausschließlich bei Eukaryonten und speziell nur in Komponenten von Multiproteinkomplexen entdeckt worden. Das MPN-Motiv entspricht einer etwa 120 Aminosäuren langen Sequenz, die eine α/β -Struktur am NH₂-Terminus der Untereinheiten Rpn8 und Rpn11 zeigt. Das genannte Motiv befähigt Rpn11 zur Zn²⁺-abhängigen Deubiquitinierung verschiedener Substrate (Verma *et al.*, 2002; Yao & Cohen, 2002). Innerhalb des *lid*-Subkomplexes gibt es einen strukturellen Cluster, der durch die Anordnung der proteasomalen Untereinheiten Rpn5, 8, 9 und 11 zustande kommt und in ähnlicher Form im CSN-Komplex existiert. Die identischen paarweisen Protein-Interaktionen innerhalb des Clusters scheinen eine konservierte Kernstruktur zu ermöglichen, die als Gerüst für die Assemblierung des jeweiligen Komplexes dienen könnte (Fu *et al.*, 2001).

Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem proteasomalen *lid*-Subkomplex und dem CSN-Komplex sowie der Befund, dass Interaktionen zwischen den Komplexen bestehen, hat die Frage aufgeworfen, ob Proteasom und Signalosom möglicherweise Teil eines Superkomplexes sind (Li & Deng, 2003). Dabei könnte der CSN-Komplex die Rolle eines „alternativen *lids*“ einnehmen und zur Regulation des kontrollierten Proteinabbaus durch das Ubiquitin-Proteasom-System beitragen. Die Daten von Hetfeld *et al.* unterstützen diese These (Hetfeld *et al.*, 2005b). Zum einen gelang der direkte Nachweis der Interaktion zwischen proteasomalen *base*-Untereinheiten und dem CSN-Komplex mittels Präzipitationsexperimenten. Zum anderen konnte mit USP15 ein CSN-assoziiertes Enzym identifiziert werden, das *in vitro* zur Deubiquitinierung der in der vorliegenden Arbeit rekombinant generierten Substrate Tetra-Ubiquitin und Ub₅-MUC₄ in der Lage war. Daneben ließ sich im Zellsystem zeigen, dass USP15 zur Stabilisierung der RING Ub-Ligase Rbx1 beiträgt. USP15 ermöglicht vermutlich durch seine deubiquitinierende Aktivität, die zum proteasomalen Abbau führende Autoubiquitinierung von Rbx1 rückgängig zu machen. Die genannten Beobachtungen belegen, dass das COP9-Signalosom mittels der assoziierten Deubiquitinase USP15 Einfluss auf die komplexe Maschinerie des Ubiquitin-Proteasom-Systems nimmt.

Das 26S Holoenzym ist im Gegensatz zum 20S Proteasom zur Degradation von nativen Proteinen befähigt. Der 19S Regulator gewährleistet – wie zuvor beschrieben – die Bindung von ubiquitinierten Proteinen (z.B. über Rpn10 und Rp5), deren Deubiquitinierung (z.B. über Rpn11), die Substratentfaltung (Rpt1-6), das Öffnen des α -Ringes (*gating* durch Rpt2) sowie die Translokation des Substrates. Das Einfädeln des Proteins kann mehreren Studien zufolge je nach Art des Substrates über dessen NH₂- oder COOH-Terminus erfolgen (Lee *et al.*, 2001; Prakash *et al.*, 2004). Die Proteolyse scheint ebenfalls substratabhängig zu sein und zur vollständigen Proteinprozessierung oder aber zur Freisetzung von nur verkürzten Proteinen zu führen. Das am besten untersuchte Beispiel dafür ist die Prozessierung des Proteins p105. Durch proteasomale Spaltung entsteht aus diesem Vorläufer das Protein p50, welches eine funktionelle Komponente des Transkriptionsfaktors NF- κ B darstellt (Palombella *et al.*, 1994). Nach Ubiquitinierung von p105 wird dessen carboxyterminaler Bereich bis zu einer Glycin-reichen (GRR) Region in der Proteinmitte durch das Proteasom degradiert. Dieses Motiv wie auch die hohe Stabilität des NH₂-Terminus von p105 sollen für den Degradationsstopp und die Freisetzung des Proteins p50 verantwortlich sein (Lin & Ghosh, 1996; Orian *et al.*, 1999). Rape *et al.* vermuten, dass im Fall von p105 die der Markierung dienende Ub-Kette auch als Anker fungiert und den noch nicht degradierten Bereich aus dem Proteasom herausführt (Rape & Jentsch, 2002). Ob das 26S Proteasom tendenziell eher größere Fragmente generiert, die dann in einer zweiten Prozessierungsrunde durch 20S Partikel bzw. Aminopeptidasen schließlich zu Peptiden bzw. Aminosäuren degradiert werden, lässt sich *in vivo* nur schwer überprüfen. Kunisawa *et al.* waren allerdings in der Lage, die Existenz solcher proteolytischen Intermediate zu zeigen (Kunisawa & Shastri, 2003). Dies gelang, da ein Teil der untersuchten Substrate durch Bindung an das Chaperon TriC vor weiterem Abbau im Cytosol geschützt war.

Die Analyse der Substratprozessierung durch das 26S Proteasom ist im Zellsystem nur unzureichend möglich. Zwar haben Mutationsstudien in verschiedenen Hefegattungen einen Einblick in die separaten Funktionen der 19S Komponenten verschafft. Der Einfluss des 19S Regulators auf die Substratproteolyse konnte aber nicht im Detail untersucht werden. Dazu wäre ein effizientes *in vitro* Degradationssystem nötig, das den Einsatz von Prozessierungsinhibitoren in wirksamen Konzentrationen sowie eine eingehende Analyse der Verdauprodukte erlaubt. Die Vorteile eines solchen *in vitro* Systems sowie die Schwierigkeiten bei seiner Etablierung werden im Kapitel 1.3 erläutert.

1.1.2.3 Das Hybridproteasom und der PA28-20S-Komplex – die Funktion von PA28

Die Daten von Bose *et al.* deuten auf einen Regulationsmechanismus hin, über den die Menge an 26S Proteasomen in Zellen durch eine erhöhte IFN γ -Konzentration gesteuert werden kann (Bose *et al.*, 2004). Das Cytokin IFN γ wirkt immunregulatorisch und wird hauptsächlich von antigenstimulierten T-Helferzellen sowie von aktivierten Makrophagen und natürlichen Killerzellen ausgeschüttet. Es beeinflusst verschiedene Stufen des Ubiquitin-Proteasom-Systems:

- IFN γ stimuliert die Expression von einigen Ub-konjugierenden sowie deubiquitinierenden Enzymen sowie die von Komponenten des MHC Klasse II- und I-Präsentationsweges:
- Es induziert im Säugerzell-System den Austausch der drei katalytisch aktiven proteasomalen β -Untereinheiten durch drei neusynthetisierte Polypeptide, die sogenannten Immunountereinheiten i β 1 (Lmp2), i β 2 (MECL1) und i β 5 (Lmp7) (Brown & Monaco, 1993; Frentzel *et al.*, 1993; Groettrup *et al.*, 1997). Die Inkorporation von i β 1, i β 2, i β 5 in den 20S *core*-Partikel im Zuge der proteasomalen *de novo* Assemblierung führt zur Entstehung von Immunoproteasomen, die spezifische antigene Peptide mit einer höheren Effizienz generieren als ihre konstitutiven Pendanten (Standardproteasomen) und auf diese Weise die MHC Klasse I-vermittelte Antigenpräsentation modulieren (Cerundolo *et al.*, 1995; Sijts *et al.*, 2000).
- IFN γ stimuliert die Expression des Proteasom-Aktivators PA28. Er kann mit dem 20S Proteasom sowie mit dem RP₁CP 26S Proteasom assoziieren, so dass PA28-20S-Komplexe bzw. Hybridproteasomen entstehen. Für PA28-20S-Komplexe ist nachgewiesen, dass sie die proteasomale Generierung von bestimmten MHC Klasse I-Liganden modulieren (Sijts *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2002).
- Das Cytokin nimmt auf die Stabilität des 26S Proteasoms Einfluss (Bose *et al.*, 2004).

Bose *et al.* konnten zeigen, dass die Behandlung von COS-7-Zellen mit IFN γ eine reduzierte Phosphorylierung der proteasomalen Untereinheit α 7 und eine verringerte Menge an 26S-Komplexen zur Folge hat. Die Abnahme an 26S Holoenzymen ging einher mit der Zunahme an PA28-Komplexen und Immunoproteasomen. Dieses Ergebnis unterstützt ein Modell, nach welchem der IFN γ -induzierte Zerfall der 26S Proteasomen in deren Subeinheiten 20S und 19S zum einen die Bildung von PA28-20S-Komplexen bzw. Hybridproteasomen fördert und zum anderen Platz schafft für die entstehenden Immunoproteasomen.

Der Regulator PA28 ist Anfang der 90er Jahre von vier Gruppen gleichzeitig entdeckt worden (Di Cola, 1992; Dubiel *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1992; Yukawa *et al.*, 1991). Die Bezeichnung des Komplexes als Proteasom-Aktivator geht auf den Befund zurück, dass dessen Bindung an den 20S *core*-Partikel zu einer hundertfach stimulierten Hydrolyse von fluorogenen Peptidsubstraten führt. Im Gegensatz zum 19S Regulator erfolgt die PA28-vermittelte Proteasomstimulierung unabhängig von ATP und beschränkt sich auf die peptidspaltende Fähigkeit des Proteasoms (Li & Rechsteiner, 2001). Der PA28-Komplex hat eine Ringform, die durch Assemblierung der etwa 30kDa großen PA28 α - und PA28 β -Untereinheiten in einem Verhältnis von 1:1,3 zustande kommt (Zhang *et al.*, 1999). Die Röntgenstruktur-Analyse von nur aus PA28 α -Untereinheiten rekombinant generierten Komplexen zeigte eine heptamere Anordnung der Proteine und weist damit auf eine $\alpha_3\beta_4$ Stöchiometrie innerhalb des PA28 $\alpha\beta$ -Komplexes hin (Knowlton *et al.*, 1997). Knowlton *et al.* konnten des Weiteren feststellen, dass die analysierten α -Untereinheiten größtenteils in Form von α -Helices vorliegen. Für die zwischen Helix zwei und drei befindliche Schleife wurde in nachfolgenden Studien ein proteasomaktivierender Effekt ermittelt, der die Bezeichnung dieser Struktur als *activation loop* veranlasste (Zhang *et al.*, 1998).

Daten zum Mechanismus der PA28-induzierten Proteasomstimulierung wurden erstmals von Whitby *et al.* präsentiert (Whitby *et al.*, 2000). Der Arbeitsgruppe gelang die Kristallisation eines heterologen Komplexes aus dem Hefe 20S Proteasom und dem 11S Regulator (PA26) aus *Trypanosoma brucei*. Da in Hefe kein PA28 homologer Proteasom-Aktivator existiert, wurde PA26 aus *Trypanosoma brucei* für die Studie eingesetzt, der eine dem humanen PA28-Komplex sehr ähnliche Struktur aufweist und zur Stimulierung der peptidspaltenden Aktivität des Hefe 20S Proteasoms in der Lage war. Die Röntgenstruktur-Analyse demonstrierte, dass sich die PA26-Öffnung auf der Symmetrieachse des 20S *core*-Partikels befindet (Abb. 6A).

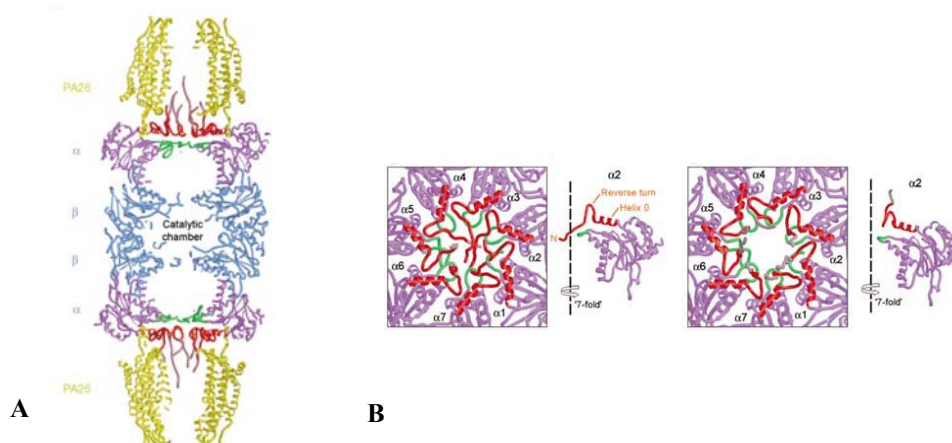


Abb. 6: Die PA26-vermittelte Proteasomaktivierung. (A) Der vertikale Schnitt durch das *ribbon drawing*-Modell eines kristallisierten PA26-20S-Komplexes verdeutlicht die Umordnung der aminoterminalen Bereiche der α -Untereinheiten durch den PA26-Komplex: Grün ist der verbleibende α -Ring dargestellt. Rot kennzeichnet NH_2 -terminale Reste der α -Untereinheiten, die keine Homologie zu Regionen in den β -Untereinheiten aufweisen. Ungeordnete NH_2 -Termini der α -Untereinheiten erscheinen in pink. (B) Das *ribbon drawing*-Modell zeigt (links) den proteasomalen α -Ring und für diesen nach PA26-Bindung (rechts) eine Konformationsänderung, die zur Ringöffnung führt. Die Abbildungen wurden Whitby *et al.* entnommen (Whitby *et al.*, 2000).

Die COOH-terminalen Regionen der PA26-Untereinheiten sind für die Bindung des 20S *core*-Partikels von Bedeutung und bewirken eine Verschiebung der NH_2 -Termini der proteasomalen α -Untereinheiten aus dem Zentrum heraus, was die Aufhebung von Wasserstoffbrücken-Bindungen und van der Waals-Interaktionen zur Folge hat. Die NH_2 -terminalen Ausläufer der proteasomalen α -Untereinheiten reichen nun in die PA26-Öffnung hinein und passieren dabei die *activation loops*. Diese scheinen eine sehr rigide Struktur zu haben, die das 20S Proteasom in eine zur Aktivierung führende Konformation zwingt und letztlich eine stabilisierte Öffnung des α -Ringes, also einen *gating*-Effekt bewirkt (Abb. 6B). Eine veränderte Konformation des gesamten Proteasomkomplexes einschließlich des proteolytischen Bereiches konnte allerdings nicht festgestellt werden.

Die Präsenz von PA28 hat *in vivo* wie auch *in vitro* mit Hilfe isolierter 20S Proteasomen zu einer verbesserten Präsentation bestimmter proteasomal generierter MHC Klasse I-Liganden geführt (Dick *et al.*, 1996; Groettrup *et al.*, 1996; Kuckelkorn *et al.*, 2002; Preckel *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2002). Dabei konnte für den Aktivator das Potential zur Modulierung von Quantität, Länge und Spezifität proteasomaler Produkte ermittelt werden. Um herauszufinden, auf welche Weise PA28 Einfluss auf die proteasomale Produktgenerierung nimmt, haben Stohwasser *et al.* kinetische Studien zur PA28-vermittelten Stimulierung der peptidspaltenden Proteasomaktivität durchgeführt (Stohwasser *et al.*,

2000). Die Ergebnisse unterstützen den von Whitby *et al.* durch Strukturanalysen ermittelten Befund, dass die PA28-induzierte Aktivierung das Resultat eines *gating*-Effektes ist, der den Substratzustrom bzw. die Produktfreisetzung moduliert (Whitby *et al.*, 2000). Stohwasser *et al.* zufolge liegen diesem Effekt sehr wahrscheinlich Konformationsänderungen im 20S *core*-Partikel zugrunde, die eine Substratbindung mit höherer Affinität an die katalytischen Zentren ermöglichen.

Die Beobachtung, dass 19S Regulator und PA28 parallel an jeweils eine Seite des 20S *core*-Partikels binden können, also Hybridproteasomen existieren, hat zu dem folgenden Modell geführt (Hendil *et al.*, 1998; Tanahashi *et al.*, 2000): Während 19S Regulator und 20S *core*-Partikel die Bindung und Prozessierung ubiquitinerter Substrate gewährleisten, könnte die aktivierende Eigenschaft von PA28 zu einer effizienteren Freisetzung von Produkten führen. Kopp *et al.* untersuchten die peptidspaltende Aktivität rekonstituierter Hybridproteasomen und konnten für diese die gleiche Aktivität ermitteln wie für 26S Proteasomen mit zwei 19S Regulatoren (Kopp *et al.*, 2001). Da die beiden Regulatoren PA28 und 19S offensichtlich über das gleiche Potential beim *gating* verfügen, ist eine zusätzliche Funktion von PA28 innerhalb des Hybridkomplexes wahrscheinlich. Cascio *et al.* verglichen isolierte 26S Proteasomen und rekonstituierte Hybridproteasomen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, bereits denaturierte Proteine (IGF-1, Casein, Ovalbumin) *in vitro* zu degradieren (Cascio *et al.*, 2002). Es waren allerdings keine gravierenden Unterschiede, z.B. in der Produktlänge festzustellen. Auch BenShahar *et al.* konnten mittels Analysen zur *in vitro* Degradation von ODC-Ova-Konstrukten durch 26S Proteasomen keinen signifikanten Einfluss von PA28 auf die Produktgenerierung ermitteln (Ben-Shahar *et al.*, 1999).

Möglicherweise erschließen sich die Eigenschaften und Besonderheiten des Hybridkomplexes erst unter Verwendung ubiquitinerter Substrate. Mit Hilfe eines funktionellen *in vitro* Systems zur Analyse der proteasomalen Prozessierung ubiquitinerter Substrate ließe sich zum einen die Funktion von PA28 innerhalb eines Hybridproteasoms untersuchen und zum anderen die Rolle des PA28-20S-Komplexes als potentiell post-26S proteasomales Degradationssystem. Der Befund, dass PA28 IFN γ -induzierbar ist und die Generierung bestimmter T-Zell-Epitope moduliert, weist auf seinen Beitrag zur Etablierung einer Immunantwort hin. Gerade für die Entwicklung von Strategien, die eine wirkungsvolle Immunantwort zum Ziel haben, ist ein effizientes *in vitro* Abbausystem für Proteinsubstrate notwendig. Dieses kann zu klären helfen, wie PA28 die Prozessierung natürlicher Antigene beeinflusst bzw. verbessert und die Entwicklung von synthetischen Polyepitop-Vakzinen unterstützen, die auf einer effizienten Epitopgenerierung aufbauen.

1.2 DAS UPS ALS BESTANDTEIL DER ZELLVERMITTELTEN IMMUNANTWORT

Zu den proteasomalen Substraten zählen neben Proteinen auch als DRiPs (*defective ribosomal products*) bezeichnete Polypeptide, die bereits während der Translation vermutlich aufgrund einer fehlerhaften Faltung proteasomal degradiert werden (Schubert *et al.*, 2000). Solche co-translationalen Fehlfaltungen können zelleigene, aber auch virale Proteine betreffen, die nach Infektion der Zelle oder einer Virusreaktivierung mittels des zellulären Translationsapparates synthetisiert werden. DRiPs

stellen ein Reservoir für die Generierung von T-Zell-Epitopen durch das Ubiquitin-Proteasom-System dar. Dieses Abbausystem ist damit die Basis für den einen von zwei Bereichen der zellvermittelten Immunantwort: den MHC Klasse I Antigen-Präsentationsweg. Während die meisten Körperzellen MHC-Klasse I-Moleküle exprimieren und über diese den cytotoxischen T-Zellen Epitope präsentieren, ist der zweite Bereich, die Antigenpräsentation über MHC Klasse II-Moleküle, auf die klassischen antigenpräsentierenden Zellen beschränkt. Zu diesen gehören z.B. B-Lymphozyten, Dendritische Zellen und Makrophagen, welche extrazelluläre Partikel und Mikroorganismen über Endocytose bzw. Phagocytose internalisieren und in dem Endosomal-Lysosomal Zellkompartiment durch saure Hydrolasen degradieren (Abb. 7A).

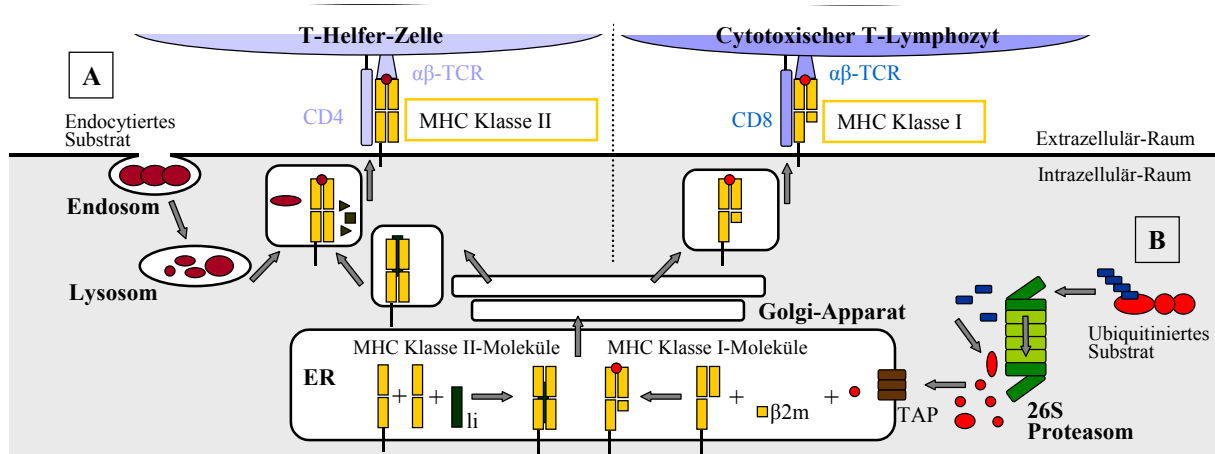


Abb. 7: Hauptwege der zellulären Epitopgenerierung und Präsentation. (A) MHC Klasse II-Präsentationsweg. Endocytisierte Moleküle werden über das Endosomal-Lysosomale Kompartiment degradiert. MHC Klasse II-Komplexe assemblieren im Endoplasmatischen Retikulum mit einer invarianten Kette (Ii), welche erst im lysosomalen Kompartiment gespalten wird. Bei Bindung lysosomaler Produkte an die Komplexe werden diese auf MHC Klasse II-exprimierenden Zellen (z.B. Makrophagen) T-Helfer-Zellen präsentiert. **(B) MHC Klasse I-Präsentationsweg.** Ubiquitinierte Proteine sind Substrate für die proteasomale Prozessierung. Die entstehenden Produkte werden je nach Länge und Sequenz mittels TAP-Transporter in das Endoplasmatische Retikulum transferiert. Nach Bindung an MHC Klasse I-Moleküle erfolgt über den Golgi-Apparat der Transport der beladenen Komplexe an die Zelloberfläche. TCR: T-Zell-Rezeptor, β_2m : β_2 -Mikroglobulin

Entstehen dabei aus endocytisierten Proteinen Oligopeptide von 13-18 Aminosäuren Länge, werden sie bei Bindung an MHC Klasse II-Moleküle über diese an die Plasmamembran transportiert. Die Erkennung des Peptid-MHC Klasse II-Komplexes durch T-Helfer-Zellen ($CD4^+$ T-Zellen) führt zur Freisetzung verschiedener Cytokine und damit zur Stimulierung anderer immunologisch aktiver Zellen, wie z.B. $CD8^+$ T-Zellen. Die MHC Klasse I-Antigenpräsentation basiert dagegen auf der Generierung von T-Zell-Epitopen durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Abb. 7B). Ubiquitinierte Proteine werden durch das 26S Proteasom prozessiert und die Produkte in Abhängigkeit von ihrer Länge und Sequenz mittels TAP-Transporter (*transporter associated with antigen processing*) in das Endoplasmatische Retikulum transferiert. Bindet ein 9-11 Aminosäuren langes Fragment in der Peptidbindungstasche eines MHC Klasse I-Moleküls, wird der beladene MHC-Komplex über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Bei Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes durch den T-Zell-Rezeptor von cytotoxischen T-Lymphocyten ($CD8^+$ T-Zellen) werden von letztgenannten cytotoxische Faktoren, Radikale und Perforine abgegeben, die letztlich zur Lyse oder Apoptose der epitoppräsentierenden Zelle führen.

1.2.1 Proteasomen-basierte Polyepitop-Vakzine

Wie effizient die T-Zell-vermittelte Erkennung und Eliminierung von Zellen erfolgt, die virale oder tumorassoziierte Antigene präsentieren, hängt u.a. auch von dem Potential des Proteasoms ab, aus dem jeweiligen Protein T-Zell-Epitope freizusetzen. Insbesondere für die Entwicklung von DNA- und Peptid-Vakzinen gegen die Tumorbildung bzw. –manifestation wird versucht, die schwache Immunogenität der natürlichen tumorassoziierten Epitope mit einer verstärkten Epitopgenerierung oder mit veränderten, stärker immunogenen Epitop-Sequenzen zu kompensieren. Erfolge in der Tumorthherapie auf der Grundlage epitopbasierter Immunisierungen gibt es allerdings bisher vornehmlich bei den virusinduzierten Tumoren, z.B. dem HPV-induzierten Zervixkarzinom (Velders *et al.*, 2001). Die dazugehörigen Studien gelten daher auch als wegweisend für die Entwicklung von epitopbasierten Vakzinen gegen körpereigene Tumore.

Der Effekt einer verstärkten proteasomalen Epitopfreisetzung durch die Wiederholung der Epitop-Sequenz innerhalb des Substrates ist Ziel der sogenannten Polyepitop-Vakzine (Thomson *et al.*, 1995). Bei der Entwicklung einer solchen ist allerdings zu berücksichtigen, dass nicht nur die Sequenz der Epitope, sondern auch die der flankierenden Bereiche bestimmt, ob und wie effizient die Epitope aus den Vorläuferproteinen generiert werden (Del Val *et al.*, 1991; Eisenlohr *et al.*, 1992; Ossendorp *et al.*, 1996; Theobald *et al.*, 1998). Demgegenüber kann eine Veränderung innerhalb der Epitopsequenz, insbesondere an letzter Aminosäureposition sowohl die proteasomale Generierung des Epitops als auch dessen Affinität an den TAP-Transporter und an die MHC-Bindungstasche beeinflussen (Eggers *et al.*, 1995; Falk & Rotzschke, 1993; Gubler *et al.*, 1998; Uebel *et al.*, 1995). Allgemein wirkt sich die Präsenz einer hydrophoben Aminosäure (z.B. Tyrosin und Leucin) am COOH-Terminus des Epitops positiv auf die Affinität zu den Komplexen Proteasom, TAP und MHC Klasse I aus. Aber auch die Art der Aminosäuren an anderen Positionen (kurz: P) kann die proteasomale Epitopgenerierung (z.B. P4-P7) bzw. die Epitopbindung an TAP (NH₂-Terminus) und den MHC-Komplex (P2 im Fall des HLA-A*0201-Komplexes) beeinträchtigen (Falk & Rotzschke, 1993; Gubler *et al.*, 1998; Niedermann *et al.*, 1995; Uebel *et al.*, 1995).

Die für verschiedene Substrate ermittelte Abhängigkeit der Effizienz der proteasomalen Epitopgenerierung von der Substratsequenz, also der Sequenz der Epitope, deren Reihenfolge und der Art der epitopverbindenden Regionen (*linker*), ist die Grundlage für die Entwicklung von Polyepitop-Vakzinen nach dem Prinzip des *rational vaccine design*. Um zu prüfen, inwiefern die unter Berücksichtigung der verschiedenen Sequenzparameter entworfene Polyepitop-Sequenz die Effizienz der Epitopgenerierung durch das 26S Proteasom beeinflusst, ist ein funktionelles *in vitro* Abbausystem notwendig. Damit ließe sich unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen, also unter Nutzung des Ubiquitin-Proteasom-Systems, eine Analyse der 26S proteasomalen Prozessierung der Polyepitop-Sequenz durchführen und ermitteln, ob die Polyepitop-Sequenz hinsichtlich der Epitopgenerierung das Potential zu einer wirksamen Vakzine besitzt.

1.3 *IN VITRO* DEGRADATIONSSYSTEME ZUR ANALYSE DES 26S PROTEASOMS

Die Etablierung eines funktionellen *in vitro* Degradationssystems für das 26S Proteasom hat sich in der Vergangenheit als äußerst schwierig erwiesen, da es zunächst nicht möglich war, in einem zellfreien System potentielle Substrate mit Ub-Ketten definierter Länge und Anzahl zu versehen. Eine Substratmarkierung definierter Größe ist von Vorteil, wenn eine Analyse der Degradationsprodukte mittels Massenspektrometrie angestrebt wird. Um das Problem der Ubiquitinierung zu umgehen, hat sich die Analyse des 26S Proteasoms zunächst auf die *in vitro* Degradation von Proteinen beschränkt, die unabhängig von einer Polyubiquitinierung erfolgt:

- Die Arbeitsgruppe um A. Goldberg hat Ovalbumin, β -Casein und rekombinantes IGF als Substrate eingesetzt, die zuvor auf chemischem Wege denaturiert wurden und daher nicht nur vom 26S Proteasom, sondern auch von SDS-aktivierten 20S Proteasomen degradiert werden konnten (Kisselev *et al.*, 1999b). Die Analyse der *in vitro* Abbauxperimente mit 26S bzw. 20S Proteasomen und den genannten Substraten (2h Inkubation) zeigte, dass beide Proteasomtypen prozessiv arbeiteten und Fragmente der Länge von 3-22 Aminosäuren generierten. Etwa 15% der Peptide hatten die zur Bindung an MHC Klasse I-Moleküle erforderliche Länge, 65% waren kürzer. Die Produkte des 20S Proteasoms waren nicht mit denen des 26S Proteasoms identisch.
- Die Gegenüberstellung der Analysen zu Degradationsexperimenten mit Immuno- bzw. Standard-26S Proteasomen und dem Substrat Ovalbumin machte deutlich, dass beide Proteasomenpopulationen *in vitro* innerhalb von 9h das immunodominante Epitop SIINFEKL ähnlich gut generierten (Cascio *et al.*, 2001). Das Immunoproteasom erzeugte aber 2-4 mal mehr NH₂-terminal verlängerte Epitop-Vorläufer als der Standardkomplex. Cascio *et al.* leiteten von diesem Ergebnis das folgende Modell ab: Ein Großteil der MHC-bindenden Epitope geht aus Vorläuferpeptiden hervor und wird letztlich durch die trimmende Eigenschaft der cytosolischen bzw. ER-residenten Aminopeptidasen freigesetzt.
- Die Arbeitsgruppe um H. Schild führte ähnliche Analysen durch. Abbauxperimente mit nicht modifiziertem β -Casein haben für 26S und 20S Proteasomen gezeigt, dass diese verschiedene Fragmente generierten, die zum Teil überlappen (Emmerich *et al.*, 2000).
- Die Gruppe von Y. Reiss nutzte dagegen ein von Murakami *et al.* 1992 veröffentlichtes System des ubiquitinunabhängigen und antizymvermittelten Abbaus von Ornithin-Decarboxylase (ODC) durch das 26S Proteasom (Hayashi, 1995; Murakami *et al.*, 1992). ODC wird dabei der ATP-abhängigen proteasomalen Degradation zugeführt, in dem das chaperonähnliche Protein Antizym an das homodimere ODC bindet und in diesem konformationelle Änderungen auslöst. Unter Y. Reiss wurde intaktes Ovalbumin als Teil eines ODC-Ovalbumin Fusionsproteins rekombinant gewonnen und *in vitro* mit Hilfe von Antizym vom 26S Proteasom abgebaut. Dabei wurden bei Substratsättigung 3% des Fusionsproteins in einer Stunde umgesetzt (Ben-Shahar *et al.*, 1999).

Die Arbeitsgruppe um C. Pickart hat im Jahr 2000 eine Methode etabliert, die die Anheftung definierter Ubiquitinketten an das zu analysierende Substrat erlaubt (Thrower *et al.*, 2000). Dieses Verfahren eröffnete damit erstmals die Möglichkeit, native Proteine *in vitro* und unter *in vivo*

ähnlichen Bedingungen, also in einer ubiquitin- und ATP-abhängigen Weise, mittels des 26S Proteasoms zu prozessieren.

Basis der von Thrower *et al.* publizierten Methode ist das System des UFD (*Ub fusion degradation*).

1.3.1 Substratabbau auf Grundlage des UFD-Systems

Die Technik, Ubiquitin als NH₂-terminalen Bestandteil eines Fusionsproteins einzusetzen, wurde in den Jahren 1985 bzw. 1986 entwickelt. Dabei wurde zunächst auf DNA-Ebene durch Klonierung eine Fusionskassette erstellt, die in *S. cerevisiae* zur Synthese eines Fusionsproteins aus Ubiquitin und bakterieller β -Galaktosidase (Ub- β -Gal) führte (Bachmair *et al.*, 1986). Es zeigte sich, dass der Ub-Anteil in eukaryontischen Zellen sehr schnell nach Proteinsynthese abgespalten wurde. Die Proteasen, die zur Hydrolyse einer auf Ubiquitin folgenden Peptidbindung in der Lage sind, gehören zu den deubiquitinierenden Enzymen (DUBs) und können zum Teil auch Ubiquitin-C-terminale Isopeptidbindungen spalten (Pickart, 1997; Wilkinson, 1997). Die Fähigkeit, eine lineare Ubiquitin-Protein-Fusion zu trennen hat u.a. die physiologische Funktion, Ubiquitin aus Vorläuferproteinen freizusetzen. Ubiquitin wird als lineares Poly-Ubiquitin synthetisiert und posttranslational prozessiert (Baker *et al.*, 1992; Finley *et al.*, 1987; Ozkaynak *et al.*, 1984). Es kommt auch als Fusion mit verschiedenen ribosomalen Untereinheiten (z.B. L40, S27a/S37, P1) vor und scheint, bevor es abgespalten wird, zur korrekten Positionierung der ribosomalen Proteine im Ribosomkomplex beizutragen (Archibald *et al.*, 2003; Ozkaynak *et al.*, 1987; Redman & Rechsteiner, 1989). Neben der Ubiquitinfreisetzung ist auch der Proteinabbau durch das Proteasom von der Spaltung linearer Ubiquitin-Fusionen abhängig. Für die Substrate MyoD, das E7-Protein des Humanen Papillomvirus Typ16 sowie das Protein LMP1 des Epstein-Barr Virus ist gezeigt worden, dass die Ubiquitinierung nicht – wie gewöhnlich – über substratinterne Lysine stattfindet, sondern am NH₂-Terminus der Substrate erfolgt (Aviel *et al.*, 2000; Breitschopf *et al.*, 1998; Reinstein *et al.*, 2000). Dies führt höchstwahrscheinlich zur Bildung einer linearen Ubiquitin-Substrat-Fusion, die im Laufe der proteasomalen Substratprozessierung gespalten wird. Der Prozess des Substratabbaus auf der Grundlage einer solchen linearen Ubiquitin-Substrat-Fusion wird als UFD-Weg (*Ub fusion degradation*) bezeichnet.

Die Gruppe um C. Pickart nutzte dieses System, um das Substrat DHFR (Dihydrofolat-Reduktase) der ATP- und ubiquitinabhängigen Degradation durch das Proteasom zuzuführen (Haldeman *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1995; Piotrowski *et al.*, 1997; Thrower *et al.*, 2000). Es wurde ein ³⁵S-markiertes Ubiquitin-DHFR-Fusionsprotein rekombinant generiert (Abb. 8). Ebenfalls *in vitro* gewonnenes Tetra-Ubiquitin konnte mittels eines Ub-aktivierenden E1-Enzyms und des Ub-konjugierenden E2-Enzyms E2-25K isopeptidisch mit dem Fusionsprotein verknüpft werden. E2-25K katalysiert die Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen der ϵ -Aminogruppe des K48 des einen Ub-Moleküls und der Carboxygruppe des G76 des anderen. Das Ub-Molekül innerhalb des Fusionsproteins wies einen Aminosäureaustausch an Position 76 auf (G76V), um eine vorzeitige DUB-vermittelte Abspaltung des als Erkennungssignal fungierenden Ub-Anteils zu verhindern. Da für den Konjugationsprozess zudem

Tetra-Ubiquitin verwendet wurde, das an der nicht gebundenen Aminosäureposition 48 durch einen K48C-Austausch blockiert war, erfolgte die Generierung des Substrates Ub₅V76-DHFR definiert über die Verknüpfung zwischen dem freien COOH-Terminus des Tetra-Ubiquitins und dem K48 des Ub-DHFR-Fusionsproteins.

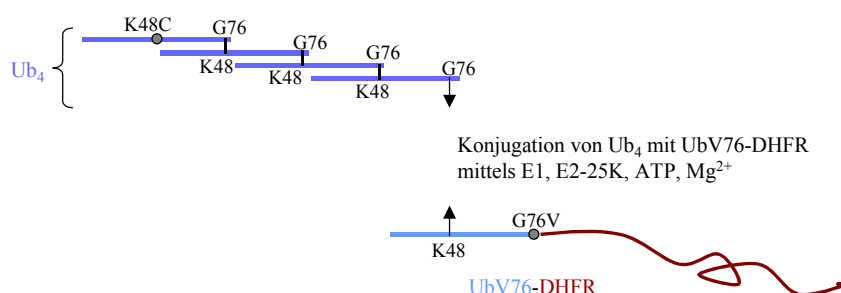


Abb. 8: Die rekombinante Generierung des Substrates Ub₅V76-DHFR nach Thrower *et al.* Es wurde Tetra-Ubiquitin gewonnen, das an der einzig nicht besetzten Position 48 einen K48C-Austausch aufweist, der die Bildung einer Isopeptidbindung an dieser Stelle unmöglich macht. Damit erfolgte die anschließende Generierung des Substrates Ub₅V76-DHFR definiert durch Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen dem K48 des Ub-DHFR-Fusionsproteins und dem freien G76 des Tetra-Ubiquitins (Thrower *et al.*, 2000).

Die von Thrower *et al.* ausgeführte Analyse der *in vitro* Degradation des Substrates Ub₅V76-DHFR mittels aus Erythrozyten isoliertem 26S Proteasom zeigte einen Substratabbau von 10% innerhalb einer halben Stunde und demonstrierte, dass Ub₄ das minimale und universale Signal für die proteasomale Substraterkennung darstellt. Das von Thrower *et al.* vorgestellte Degradationssystem greift damit nicht nur auf eine für den 26S proteasomalen Abbau notwendige und typische Art der Substratmarkierung zurück, sondern weist auch eine *in vivo* ähnliche Abbaurrate auf. Damit zeigte sich diese auf dem UFD-Weg begründete Methode als viel versprechend, um die 26S proteasomvermittelte Substratprozessierung und Generierung von T-Zell-Epitopen aus immunologisch relevanten viralen und Tumorantigenen zu untersuchen.

1.3.2 Das HPV16 E7-Protein als proteasomales Substrat

Das Protein E7 des Humanen Papillomvirus Typ16 ist immunologisch von besonderem Interesse und durch seine nachweislich ubiquitin- und proteasomabhängige Degradation als Substrat für das vorgestellte *in vitro* Abbausystem prädestiniert. HPV16 wird in etwa der Hälfte aller zervikalen Tumore detektiert und in die Kategorie der *high-risk* Viren eingestuft, da die durch dieses Virus verursachten Läsionen mit hoher Wahrscheinlichkeit zu der Ausbildung bösartiger Tumore führen (Munger & Howley, 2002). Das Zusammenspiel der nach Infektion früh synthetisierten Proteine E6 und E7 nimmt bei diesem Vorgang eine zentrale Rolle ein. Als Onkogen-Produkte sind E6 und E7 zur Initiierung der Zelltransformation in der Lage, indem sie die komplexe und enge Verknüpfung zwischen zellulärer Differenzierung und Proliferation aufheben. Vermutlich ist dafür die Eigenschaft

des E7-Proteins mitverantwortlich, das Tumorsuppressorgen-Produkt pRB zu binden und zu destabilisieren. Damit wird dessen Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor E2F aufgehoben, was die E2F-Aktivierung und damit die Fortführung der Zellzyklus-Progression an Stufe G1/S zur Folge hat (Berezutskaya *et al.*, 1997; Boyer *et al.*, 1996; Giarre *et al.*, 2001; Helt & Galloway, 2001).

HPV16 E7 ist ein kurzlebiges Protein, das durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird. Seine Halbwertszeit beträgt etwa 30-40 Minuten (Reinstein *et al.*, 2000; Selvey *et al.*, 1994). Die zur Degradation führende Ubiquitinierung erfolgt aber nicht an substratinternen Lysin-Resten, sondern NH₂-terminal des Proteins (Reinstein *et al.*, 2000). Damit zählt HPV16 E7 zu den Proteinen, die *in vivo* über den UFD-Weg abgebaut werden und sich für UFD-basierte *in vitro* Abbaustudien anbieten. Diese können Aufschluss über die Prozessierungseigenschaften des Proteasoms geben, insbesondere hinsichtlich der Generierung des immunodominanten und HLA-A*0201 restringierten Epitopes E7₁₁₋₂₀ (Ressing *et al.*, 1995). Daneben ließen sich Hinweise gewinnen, die die Entwicklung einer Proteasomen-basierten Polyepitop-Vakzine gegen die Manifestierung einer HPV16-Infektion unterstützen können.

1.3.3 Das Protein MUC1 als proteasomales Substrat

Auch das membranständige Glykoprotein Mucin1 (MUC1) unterliegt einer proteasomalen Prozessierung. Es wird auf der apikalen Seite von Epithelzellen der Drüsen und Ausführungsgänge präsentiert und trägt zur Befeuchtung der Zelloberflächen und damit auch zum Schutz vor Mikroorganismen und extrazellulären Abbauenzymen bei (Brayman *et al.*, 2004). MUC1 gehört zu den Tumormarkern und kommt als Mitglied der Gruppe der stark exprimierten Tumorantigene sowohl in normalen Geweben als auch in histologisch verschiedenartigen Tumoren vor (Parmiani *et al.*, 2003). Die MUC1 Überexpression erfolgt in besonderem Maße auf Adenokarzinomen und hämatologischen Tumoren wie dem Multiplen Myelom und dem B-Zell-Lymphom. Eine starke Überexpression gilt als Hinweis auf ein hohes metastatisches Potential und auf eine schlechte Prognose der Tumorerkrankung (Fung & Longenecker, 1991; Kobayashi *et al.*, 1992). Charakteristisch für die Familie der Mucine ist eine große Domäne aus sich tandemartig wiederholenden bzw. sequenzähnlichen Abschnitten (VNTR: *variable numbers of tandem repeats*). Unter diesen befindet sich auch das HLA-A*0201 restringierte Epitop MUC1₉₅₀₋₉₅₈ (STAPPVHNV) (Brossart *et al.*, 1999). G. Hoffmann hat in ihrer Promotionsarbeit, die auf die Entwicklung einer Proteasomen-basierten Polyepitop-Vakzine abzielte, zeigen können, dass das genannte Epitop *in vitro* vom 20S Proteasom aus einer synthetischen Epitopfolge heraus generiert wird (Hoffmann, 2004). Eine NH₂-terminale Fusion der Epitopfolge mit Ubiquitin hatte im Zellmodell zu einer proteasomenvermittelten Substratdestabilisierung geführt und damit deutlich gemacht, dass auch eine MUC1₉₅₀₋₉₅₈-Mehrfachsequenz als Bestandteil eines Ubiquitin-Substrat-Fusionsproteins proteasom-abhängig degradiert wird. Es wäre zu prüfen, ob sich eine MUC1₉₅₀₋₉₅₈-Mehrfachsequenz auch als Substrat für ein UFD-basiertes *in vitro* Abbausystem zur Charakterisierung des 26S Proteasoms eignet und damit erlaubt, die 26S proteasomale Effizienz der Epitopgenerierung zu ermitteln.

1.4 ZIEL DER ARBEIT

Die enorme Bedeutung des 26S Proteasoms für die intrazelluläre Proteindegradation, die Zellregulierung und Immunantwort macht dieses proteolytische System für die Grundlagen- und die medizinische Forschung zu einem Schwerpunkt. Allerdings war eine systematische Untersuchung der prozessierenden Eigenschaften des 26S Proteasomes bisher nicht möglich, da ein dazu notwendiges effizientes *in vitro* Abbausystem fehlte. Mit der von Thrower *et al.* im Jahr 2000 veröffentlichten UFD-basierten Methode stand ein Verfahren zur Verfügung, das die Generierung eines ³⁵S-markierten tetra-ubiquitinierten Ub-DHFR-Fusionsproteins in kleinem Maßstab sowie dessen *in vitro* Degradation durch das 26S Proteasom in einer ATP-abhängigen Weise erlaubte (Thrower *et al.*, 2000).

Auf Grundlage dieser Methode sollte eine Untersuchung der 26S proteasomalen Antigenprozessierung, also der Degradation immunologisch relevanter Proteine durch das Proteasom, unter dem Aspekt der Epitopgenerierung erfolgen. Es galt, das HPV16 E7-Protein *in vitro* zu generieren, zu ubiquitinieren und einer Prozessierung durch isolierte 26S Proteasomen zu unterziehen. Das Verfahren war hinsichtlich einer größeren Substratquantität und einer höheren Abbaurate zu optimieren, um eine eingehende Produktanalyse mittels Massenspektrometrie vornehmen zu können. Die Analyse sollte auf die proteasomale *in vitro* Prozessierung weiterer Substrate, insbesondere der von Polyepitop-Konstrukten auf Basis des Epitops MUC1₉₅₀₋₉₅₈ aus dem tumorassoziierten Glykoprotein Mucin1, ausgeweitet werden.

Nach Etablierung des UFD-basierten Abbausystems für die genannten ubiquitinierten Substrate war eine biochemische Analyse der proteasomalen Prozessierungsschritte geplant. Im Zuge dieser Analyse sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Beeinflussen ubiquitinierte Substrate die prozessierenden Eigenschaften des 26S Proteasoms?
- Welche Rolle übernimmt der Aktivator PA28 bei der proteasomalen Degradation ubiquitinierten Substrate im Zusammenspiel mit dem 26S-Komplex? Führt die Bildung von Hybridproteasomen bzw. von PA28-20S-Komplexen zu einer modulierten Produktgenerierung, wie sie *in vivo* für den Aktivator ermittelt wurde?
- Welchen Beitrag leistet die katalytische Untereinheit $\beta 5$, die als proteasomale Hauptaktivität gilt, zum Abbau ubiquitinierten Substrate?

Neben den grundlagenorientierten Untersuchungen zur 26S proteasomalen Substratdegradation hatte die Analyse der *in vitro* Prozessierung von Polyepitop-Konstrukten auch ein anwendungsbezogenes Ziel. Es galt zu prüfen, ob sich mit Hilfe des UFD-basierten Abbausystems analysieren lässt, wie effizient das 26S Proteasom Epitope aus dem Kontext verschiedener Sequenzen generiert. Die UFD-basierte Methode sollte damit als Testsystem etabliert werden, mit dem *in vitro* das Potential einer Polyepitop-Vakzine hinsichtlich einer optimierten Epitopgenerierung durch das 26S Proteasom ermittelt werden kann.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterial

| | |
|--|-----------------|
| 3 MM Papier | Whatman |
| Acrylamidlösung 30%, 29:1 | Roth |
| Acryl-Küvetten | Sarstedt |
| ADP (Adenosin-Diphosphat) | Sigma |
| Agarose | Serva |
| 6-Aminohexansäure | Roth |
| Ammoniumacetat (NH ₄ OAc) | AppliChem |
| Ammoniumchlorid | Merck |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma |
| AMP (Adenosin-Monophosphat) | AppliChem |
| Ampicillin | Amersham |
| Arginin-Sepharose 4B | Serva |
| ATP (Adenosin-Triphosphat) | Sigma |
| ATP _γ S | Serva |
| Borsäure | AppliChem |
| Bacto-Agar | AppliChem |
| Bacto-Trypton | AppliChem |
| β-Mercaptoethanol | Serva |
| Bromphenolblau | AppliChem |
| BSA (Bovines Serum Albumin), proteasefrei | Sigma |
| Calciumchlorid (CaCl ₂) | Sigma |
| clasto-Lactacystin, β-Lacton | Calbiochem |
| DEAE-650S, Toyopearl | Tosohaas |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | AppliChem |
| DMEM | Biochrom |
| DMF (Dimethylformamid) | Sigma |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Fluka |
| dNTP | Invitrogen |
| DTT (Dithiothreitol) | AppliChem |
| EDTA | AppliChem |
| Epoxomicin | Calbiochem |
| Essigsäure | Merck |
| Ethanol | Baker |
| Ethidiumbromid | AppliChem |
| Ethylenimin (EI) | Greyhound |
| Erythrozytenkonzentrat (aus Humanblut, frisch) | Charité, Berlin |
| Filterhalter, 0,2µm Porengröße | Corning |
| Filtrationseinheiten für verschiedene Volumina, 0,2µm Porengröße | Corning |
| Filtergewebe PETEX, Porengröße 20µm | SEFAR AG |
| Fötale Kälberserum (FCS) | Biochrom |
| Fluorogene Peptidsubstrate | Bachem |
| Glukose | Roth |
| Glycerol | Roth |
| GST-bind resin | Novagen |
| Hefeextrakt | DIFCO |
| Imidazol | AppliChem |
| IPTG, dioxanfrei | Roth |
| Isopropanol | Baker |
| Kaliumacetat (KOAc) | Merck |
| Kaliumchlorid (KCl) | AppliChem |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | AppliChem |
| Kaliumhydroxid (KOH) | Merck |
| Kanamycin | Serva |
| Kreatinphosphat | Sigma |
| Kryo-Röhrchen | Nunc |
| L-Glutamin | Biochrom |
| Glycogen-Lösung | Roche |
| Magnesiumsulfat (MgSO ₄) | Sigma |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | AppliChem |

| | |
|--|-----------------|
| Manganchlorid (MnCl ₂) | Fluka |
| Methanol | Baker |
| MG132 | Calbiochem |
| Mikrotiterplatten, schwarz | Dynatec |
| Molekulargewichtsstandard, DNA | GibcoBRL |
| Molekulargewichtsstandard, Protein <i>prestained</i> | NEB |
| MOPS | AppliChem |
| Natriumacetat (NaOAc) | AppliChem |
| Natriumacid (NaN ₃) | Merck |
| Natriumchlorid (NaCl) | AppliChem |
| Natrium-Desoxycholat (Na-DOC) | Roth |
| Natriumhydroxid (NaOH) | AppliChem |
| N-Ethylmaleimid (NEM) | Serva |
| Nickel-NTA-Matrix | QIAGEN |
| NLVS (NIP-LLL-Vinylsulfon) | Calbiochem |
| ortho-Phenanthrolin (o-PT) | Sigma |
| Penicillin/ Streptomycin | Seromed |
| Perchlor-Essigsäure | Fluka |
| Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 | Roth |
| Protease-Inhibitor Cocktail "Complete" (mit EDTA bzw. EDTA-frei) | Roche |
| PVDF-Membran, Immobilon-P (Porengröße 0,45µm) | Millipore |
| Q-Sepharose-FF | Amersham |
| Röntgenfilme Xomat-UV/AR/Biomax-MR | Kodak |
| Rubidiumchlorid (RbCl) | Sigma |
| SDS (Natriumdodecylsulfat) | AppliChem |
| Sepharose 6B | Amersham |
| Serva Blue R250 | Serva |
| SP-Sepharose-FF | Amersham |
| Streptavidin-Agarose | Novagen |
| TEMED | Roth |
| Transfektionsreagenz FuGENE 6 | Roche |
| Trifluoressigsäure (TFA) | Roche |
| Tris | AppliChem |
| Trypanblau-Lösung | Sigma |
| Trypsin-EDTA | Gibco-BRL |
| Tween 20 | Serva |
| Vivaspin-Säulchen zum Ankonzentrieren, MWCO: 5-10kDa | Vivascience |
| Xylencyanol | Serva |
| Zellkultur-Plastikwaren, steril | Falcon, Greiner |
| Zentrifugationsröhrchen (Polyallomer, 14x95mm) | Beckman |

2.1.2 Geräte

| | |
|--|--------------------|
| Agarose-Gelkammer mit Gelschlitten | Renner |
| Chromatographie-Säulen (Ø=0,5-1cm, Länge=5-15cm) | Biorad |
| Chromatographie-Säulen (Ø=0,5-2cm, Länge=20-100cm) | Amersham |
| Fluorometer BioTek Synergy HT | BioTec |
| FPLC Äkta | Amersham |
| French press | SLM AMINCO |
| GS-158 Zentrifuge | Beckman |
| Image J, Computerprogramm | NIH |
| Kühlzentrifuge 54178 | Eppendorf |
| Kühlzentrifuge Avanti J-25 | Beckman |
| Kühlzentrifuge J2-HS | Beckman |
| MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer | Applied Biosystems |
| Medifuge | Heraeus |
| Mini Protean-Gelsystem III | Biorad |
| MonoQ-Säule HR 5/5 | Amersham |
| Nano-HPLC, Ultimate, Dionex LC Packings | Dionex |
| PCR Maschine Thermocycler | Biometra |

| | |
|---|-----------|
| Photometer Ultrospec III LKB | Pharmacia |
| Power Supply PS3000 | Hoefler |
| Rollgerät für Inkubationsröhrchen Multimix | Luckham |
| Rotor G10 | Beckman |
| Rotor G14 | Beckman |
| Rotor G25,5 | Beckman |
| Rotor SW40 | Beckman |
| Rotor Ti70 | Beckman |
| <i>semi-dry</i> -Blotkammer | Owl |
| Steril <i>gard hood classII</i> A1 B3 | Baker |
| Gelfiltrationssäule, Superdex 75HR 10/30 | Amersham |
| Transmissions-Elektronenmikroskop Morgagni FEI FP5005 | FEI |
| Ultraschall-Homogenisator Sonopuls | Bandelin |
| Ultrazentrifuge L-70 | Beckman |
| Zellkultur-Inkubator BB4220CV | Heraeus |

2.1.3 Oligonukleotide

Tab. 1: Sequenzen der eingesetzten Oligonukleotide. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Bio-TEZ Berlin-Buch GmbH hergestellt.

| Bezeichnung | Sequenz 5'→3' |
|---------------------|---|
| 5'NdeI-Ub | CCC ATA TGC AGA TCT TCG TCA AGA CGT TA |
| 3'Ub-E7 | TGT ATC TCC ATG CAT AGC AGC CGC AGC AAC |
| 5'Ub-E7 | GTT GCT GCG GCT GCT ATG CAT GGA GAT ACA |
| 3'BamHI-E7 | CCG GAT CCT TAT GGT TTC TGA GAA CAG ATG GG |
| Ub-XhoI-For | GGT AAG CAG CTC GAG GAC GG |
| Ub-V76G-Rev | GC CGC AGC ACCACC TCT TAG TC |
| EcoRI-His-Ub-For | CGC TGA ATT CTG CCA CCA TGG GCC ATC ATC ATC ATC |
| EcoRV-E7-Rev | CCG ATA TCT TAT GGT TTC TGA GAA CAG |
| BamHI-Muc-For | GCG GGA TCC TCT ACT GCT CCT CCA GTT CAT AAT GTC TCC |
| ScaI-Muc-Rev | GCG AGT ACT CAC ATT GTG TAC AGG TGG TGC TGT TGA AAC |
| ScaI-Muc-For2 | GCG AGT ACT GCT CCT CCA GTT CAT AAT GTC TCC ACC GCC |
| HindIII-Muc-Rev | GCG AAG CTT CTA CAC ATT GTG TAC AGG TGG TGC TGT TGA AAC |
| BamHI-Muc938-For | GCG GGA TCC TCC ACC GCC CCC CCA GCC CAT GGT GTC ACC TCG GCC CCG GAC AAC AGG CCC GCC TTG GGC TCC ACC GCC CCT CCA GTC C |
| HindIII-Muc1025-Rev | GCG AAG CTT CTA AGT GCT ACT GGC ATC AGT CTT GGT GCT ATG GCT GGC AAG GG |

2.1.4 Vektoren

| | |
|---|--|
| pET16b-Ub-DHFR (Amp ^r) | Thrower <i>et al.</i> (Thrower <i>et al.</i> , 2000) |
| pET3a-D77 (Amp ^r) | Piotrowski <i>et al.</i> (Piotrowski <i>et al.</i> , 1997) |
| pET3a-K48C (Amp ^r) | Piotrowski <i>et al.</i> (Piotrowski <i>et al.</i> , 1997) |
| pRSV-HPV16E6/E7 (Amp ^r) | Smits <i>et al.</i> (Smits <i>et al.</i> , 1990) |
| pGEX-KG-E2-25K (Amp ^r) | M. Seeger (Institut für Biochemie, CCM, Berlin) |
| pRSET-Ub-Muc ₄ (Amp ^r) | G. Hoffmann (Institut für Biochemie, CCM, Berlin) |
| pcDNA3.1/Zeo(+) (Amp ^r) | Invitrogen |
| pJY2 (CA ^r) | Biomol |
| pEGFP-N3 (Kan ^r) | Clontech |

2.1.5 Kits

| | |
|--|--------|
| BM Chemoluminescence Blotting Substrat (POD) | Roche |
| QIAGEN Plasmid Maxi Kit | QIAGEN |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | QIAGEN |
| QIAquick Gel Extraction Kit | QIAGEN |

2.1.6 Enzyme

| | |
|--|---------------------|
| Apyrase | Sigma |
| Biotinyliertes Thrombin | Novagen |
| DNaseI | Sigma |
| High Fidelity DNA Polymerase | Roche |
| Kreatinkinase | Sigma |
| Platinum Pfx Polymerase | Invitrogen |
| Restriktionsendonukleasen | New England Biolabs |
| Shrimp Alkaline Phosphatase | Roche |
| T4-DNA Ligase | New England Biolabs |
| Ub-aktivierendes Enzym (E1) aus Säugerzellen | Biomol |
| UCH-L3 aus Kaninchen | Biomol |

2.1.7 Antikörper

| | |
|--|--|
| Kaninchen Anti-β1 (delta), 43/4 (1:1000) | AG Kloetzel, Institut für Biochemie, CCM, Berlin |
| Kaninchen Anti-Rpn11 (1:1000) | Biomol |
| Kaninchen Anti-Ubiquitin (1:1000) | Dako Cytomation |
| Maus Anti-HPV16-E7 TVG710Y (1:300) | Santa Cruz |
| Maus Anti-MUC1 ₉₅₀₋₉₅₈ , 14G2 (1:500) | A. Zvirblina, Littauen |
| Maus Anti-Rpn2 (1:1000) | Biomol |
| Maus Anti-Rpn10 (1:2000) | Biomol |
| Ratte Anti-Hsp90 (1:15000) | Stress Gene |
| Kaninchen Anti-Maus IgG-Peroxidase (1:5000) | Seramun |
| Ziege Anti-Kaninchen IgG-Peroxidase (1:5000) | Jackson ImmunoResearch |
| Ziege Anti-Ratten IgG-Peroxidase (1:1000) | Dianova |

2.1.8 E. coli-Stämme

| | |
|------------------|------------|
| DH5α | Invitrogen |
| BL21(DE3)pLysS | Novagen |
| HMS174(DE3)pLysS | Novagen |

2.2 METHODEN

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Amplifikation von DNA mittels PCR

Tab. 2 gibt Auskunft über die zur Amplifikation der Ziel-PCR-Produkte verwendeten Oligonukleotide, die Template-DNA und die spezifischen Parameter für den PCR-Annealing-Schritt. Die PCR-Produkte wurden zur Generierung der angegebenen Zielvektoren eingesetzt. Die Konzentration der einzelnen PCR-Komponenten sowie die generellen Zyklusparameter sind Tab. 3 und 4 zu entnehmen. Wie in Tab. 3 und 4 aufgeführt, wurde zur Generierung und Amplifikation der Polyepitop-Sequenzen (PCR 7 und 8) die Polymerase Platinum Pfx eingesetzt. Sie enthält ausschließlich die DNA-Polymerase aus *Thermococcus spec.* mit *proofreading*-3'→5'-Exonuklease-Funktion und ermöglicht damit eine hohe Genauigkeit bei der Elongation. Die Zugabe der Polymerase erfolgte nach dem initialen Denaturierungsschritt (*hot start*).

Tab. 2: DNA-Template, Oligonukleotide und die für den PCR-Annealing-Schritt angewandten Parameter, die zur Amplifikation der angegebenen Ziel-PCR-Produkte und damit zur Generierung der aufgeführten (→) Zielvektoren eingesetzt wurden.

| Ziel-PCR-Produkt → Zielvektor | | DNA-Template | forward Primer | reverse Primer | T/t [Annealing] |
|-------------------------------|--|---------------------------|------------------|---------------------|-----------------|
| 1. | NdeI-Ub-E7frag | pET16b-Ub-DHFR | 5' NdeI-Ub | 3' Ub-E7 | 45°C/ 45sec |
| 2. | BamHI-E7-Ubfrag | pSRV-HPV16-E6/E7 | 5' Ub-E7 | 3' BamHI-E7 | 45°C/ 45sec |
| 3. | NdeI-Ub-E7-BamHI → pET16b-UbV76-E7 | Produkt 1 und 2 | 5' NdeI-Ub | 3' BamHI-E7 | 45°C/ 1min |
| 4. | XhoI-UbG76frag | pET16b-UbV76-E7 | Ub-XhoI-For | Ub-V76G-Rev | 50°C/ 45sec |
| 5. | XhoI-UbG76-E7-BamHI → pET16b-UbG76-E7 | pET16b-UbV76-E7 | Produkt 4. | 3' BamHI-E7 | 50°C/ 45sec |
| 6. | EcoRI-Ub(G/V)76-E7-EcoRV → pcDNA-His-Ub(G/V)76-E7 | pET16b-Ub(G/V)76-E7 | EcoRI-His-Ub-For | EcoRV E7-Rev | 50°C/ 1min |
| 7. | BamHI-MUC ₄ -ScaI | pRSET-Ub-MUC ₄ | BamHI-Muc-For | Sca-Muc-Rev | 60°C /30sec |
| 8. | ScaI-MUC ₄ -HindIII → pRSET-Ub-MUC ₈ | pRSET-Ub-MUC ₄ | ScaI-Muc-For2 | HindIII-Muc-Rev | 60°C /30sec |
| 9. | BamHI-Muc938-1025-HindIII → pRSET-Ub-MUC _{long} | cDNA aus HeLa-Zellen | BamHI-Muc938-For | HindIII-Muc1025-Rev | 60°C/ 30sec |

Tab. 3: Zusammensetzung der PCR-Reaktionen

| Zusammensetzung | PCR 1-6, 9 mit Expand High Fidelity Polymerase | PCR 7 und 8 mit Platinum Pfx-Polymerase |
|--|--|---|
| H ₂ O | ad 100µL | ad 50µL |
| 10 x Reaktionspuffer | 10µL | 5µL |
| MgSO ₄ (50mM) | -- | 1mM |
| DNA | 10ng | 5ng |
| Primer, <i>forward</i> bzw. <i>reverse</i> | 0,75µM | 0,75µM |
| DNTPs | je 200µM | je 200µM |
| Polymerase | 1µL Expand High Fidelity | 0,75µL Pfx |

Tab. 4: PCR-Zyklusparameter

| Zyklusschritte | PCR mit Expand High Fidelity Polymerase | | PCR mit Platinum Pfx-Polymerase | |
|--------------------------|---|---------------|---------------------------------|-------------|
| I Initiale Denaturierung | 96°C | 3min | 94°C | 2min |
| II Denaturierung | 94°C | 30sec | 94°C | 15sec |
| III Annealing | Siehe Tab. 1 | | Siehe Tab. 1 | |
| IV Elongation | 72°C | 1min je 1,5kb | 68°C | 1min je 1kb |
| Anzahl der Zyklen II-IV | 25 | | 25 | |
| V Finale Elongation | 72°C | 5min | 68°C | 5min |

2.2.1.2 DNA-Gelelektrophorese

50x TAE-Puffer: 242g Tris-Base, 57mL Essigsäure, 100ml 0,5M EDTA-Lösung (pH=8), dH₂O ad 1L
Laufpuffer und Puffer zum Lösen der Agarose: 1x TAE-Puffer
10x DNA-Probenpuffer: 1x TAE-Puffer, 50% Glycerol, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol

Je nach Länge der zu analysierenden DNA-Fragmente wurde ein 1-2%iges Agarosegel angefertigt. Dazu wurde die entsprechende Agarosemenge in 1x TAE-Puffer aufgenommen und unter Aufkochen gelöst. Vor dem Überführen der Agaroselösung in den Gelschlitten wurde Ethidiumbromid in einer finalen Konzentration von 50µg/mL zugegeben. Zur Trennung der DNA-Fragmente wurde das Agarosegel mit DNA-enthaltenden Proben, die zuvor mit 10x DNA-Probenpuffer versetzt wurden, einer Elektrophorese bei 75-120V unterzogen.

2.2.1.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel wurde das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet.

2.2.1.4 Restriktionsspaltung von DNA

Die Spaltung von DNA erfolgte mittels Restriktionsenzymen nach den Angaben des Herstellers. Für die DNA-Spaltung im analytischen Maßstab wurden bis zu 0,5µg DNA mit 2U Restriktionsenzym für 1h Stunde bei 37°C inkubiert. Der DNA-Verdau im präparativen Maßstab wurde mit 5µg DNA und 10U Restriktionsenzym durchgeführt. Die Ansätze zur Spaltung von Vektoren enthielten zusätzlich 1U SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase), um durch Dephosphorylierung einer Vektor-Rezirkulation vorzubeugen.

2.2.1.5 Reinigung von DNA mittels Phenolextraktion

Mittels Phenolextraktion ist die Isolierung von kleinsten Mengen DNA aus einer wässrigen Protein/DNA-enthaltenden Lösung möglich. Durch Zugabe des gleichen Volumens eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) zu der wässrigen Lösung und nach Durchmischung der Phasen durch Vortexen wurde eine Denaturierung und das Ausfallen der Proteine erreicht. Die nach Zentrifugation (13000rpm, 2min) sichtbare wässrige Phase wurde entnommen und zur Ankonzentrierung der Nukleinsäure einer Ethanol-fällung unterzogen.

2.2.1.6 Ethanol-fällung von DNA

Der wässrigen DNA-enthaltenden Lösung wurde ein Zehntel Volumen 3M Natriumacetat-Lösung (pH=4,8) und das 2,5fache Volumen absoluten Ethanols zugesetzt und die Komponenten durch Vortexen gemischt. Bei geringer DNA-Menge wurde 1µL einer Glycogen-Lösung (20µg/µL) hinzugefügt, um das DNA-enthaltende Pellet nach Zentrifugation sichtbar zu machen. Das Gemisch wurde 15min auf Eis inkubiert und bei 13000rpm für 10min zentrifugiert. Das Nukleinsäure-Pellet wurde in 70%igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem definierten Volumen dH₂O gelöst.

2.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Es wurden 100ng Vektor-DNA mit einem dreifach molaren Überschuss an Fragment-DNA in einem Volumen von 10µL mit 5-10U T4-DNA-Ligase ü.N. bei 12°C inkubiert.

2.2.1.8 Herstellen kompetenter *E. coli* DH5α-Zellen

Pha-Medium: 0,5% Hefeextrakt, 2% Bactotrypton, 40mM MgSO₄ · 7H₂O; Auffüllen mit dH₂O; Einstellung des pH-Wertes von 7,6 mit 5M KOH-Lösung; Autoklavieren
Puffer TfbI: 30mM KOAc, 100mM RbCl, 10mM CaCl₂, 50mM MnCl₂, 15% Glycerol, Auffüllen mit dH₂O, Einstellen des pH-Wertes von 5,8 mit Essigsäure, Sterilfiltrieren, Aufbewahren bei 4°C
Puffer TfbII: 10mM MOPS, 75mM CaCl₂, 10mM RbCl, 15% Glycerol, Auffüllen mit dH₂O, Einstellen des pH-Wertes mit KOH-Lösung, Sterilfiltrieren, Aufbewahren bei 4°C
LB-Medium: 10g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl, ad 1L dH₂O, 0,2mL 10M NaOH-Lösung, Autoklavieren
LB-Agarplatten: LB-Medium, 1,5% Bacto-Agar, Autoklavieren und sterile Verteilung der Agarlösung in Petrischalen (20-25mL/Schale)

DH5 α -Zellen aus einem Glycerolstock wurden auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Eine vereinzelte DH5 α -Kolonie wurde ü.N. in 5mL ϕ a-Medium vermehrt und am folgenden Tag 2ml aus der Übernachtskultur zum Animpfen von 100mL ϕ a-Medium eingesetzt. Bei einer OD₆₀₀=0,5 wurde die Kultur für 5min auf Eis gehalten. Die folgenden Schritte erfolgten bei 4°C und wurden unter Verwendung steriler Zentrifugationsbehälter, Pipetten und Reaktionsgefäße ausgeführt, so dass eine Kontamination der DH5 α -Zellen verhindert wurde. Die Zellen wurden 5min bei 6000rpm pelletiert, im 0,4fachen Volumen (40mL) eiskalten TfbI-Puffers aufgenommen, resuspendiert und 15min bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen im 0,04fachen Volumen (4ml) eiskalten TfbII-Puffers aufgenommen, resuspendiert, für 15min auf Eis inkubiert und in Reaktionsgefäße aliquotiert (100 μ L). Die Zellen wurden in Trockeneis schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.1.9 Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

LB-Medium: siehe 2.2.1.8

LB-Agarplatten: siehe 2.2.1.8

Ampicillin (Amp): Stammlösung 100mg/mL in 50% Ethanol, Endkonzentration im Medium 100 μ g/mL

Chloramphenicol (CA): Stammlösung 50mg/mL in absolutem Ethanol, Endkonzentration 50 μ g/mL

Kanamycin (Kan): Stammlösung 10mg/mL in dH₂O, Endkonzentration 10 μ g/mL

Zu 100 μ L transformationskompetenten, auf Eis getauten DH5 α -Zellen wurden 10 μ L Ligationsansatz bzw. 5ng Vektor-DNA gegeben und die Ansätze für 30min auf Eis gehalten. Nach einem Hitzeschock von 20sec bei 37°C wurden die Zellen mit 0,5mL LB versetzt und für 1h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 100 μ L Medium resuspendiert und ein Aliquot auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Es schloss sich eine Inkubation ü.N. bei 37°C an.

Die Transformation der Expressionszellen BL21(DE3)pLysS und HMS174(DE3)pLysS erfolgte analog. Der Hitzeschock wurde für 30sec bei 42°C durchgeführt.

2.2.1.10 Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli*

Die Plasmidisolierung in kleinem Maßstab (Plasmid Mini-Präparation) erfolgte mittels des QIAprep Spin Miniprep Kits. Zur Analyse der Plasmid-DNA eines nach Transformation erhaltenen bakteriellen Klonen wurden 1,5mL einer Übernachtskultur in LB/Antibiotikum zentrifugiert. Die DNA wurde gemäß des genannten Protokolls isoliert und final in 30-50 μ L dH₂O aufgenommen. Zur analytischen Restriktionsspaltung wurden 7,5 μ L der DNA-enthaltenden Lösung eingesetzt.

Die Plasmidisolierung in großem Maßstab (Plasmid Maxi-Präparation) wurde mit Hilfe des QIAGEN Plasmid – Maxi Kits durchgeführt. Dazu wurden im Fall von *high copy*-Vektoren Übernachtskulturen in LB/Antibiotikum von 200mL Volumen angesetzt, pelletiert und die DNA nach Protokoll isoliert. Im Fall der *low copy*-Vektoren der pET-Gruppe erfolgte die Plasmidpräparation ausgehend von den pelletierten Zellen einer 500mL Kultur.

2.2.1.11 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die spektralphotometrische Analyse von DNA ermöglicht die Bestimmung der DNA-Konzentration in einer wässrigen Lösung. Auf Basis des Lambert-Beer'schen Gesetzes gelten die folgenden Zusammenhänge: Eine bei der Wellenlänge 260nm ermittelte Absorption (A₂₆₀) von 1 entspricht einer Konzentration an doppelsträngiger DNA von 50 μ g/mL bzw einer Konzentration an einzelsträngiger DNA von 30 μ g/mL.

2.2.1.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Vektor-DNA wurde von der Firma Agowa GmbH Berlin ausgeführt.

2.2.2 Rekombinante Generierung penta-ubiquitiniertes Modellsubstrate

2.2.2.1 Generierung des E2-Enzyms E2-25K

2xYT-Medium: 16g Bacto-Trypton, 10g Hefeextrakt, 5g NaCl, ad 1L dH₂O, pH-Wert-Einstellung mit 0,2mL 10M NaOH, Autoklavieren

E2-Lysis-Puffer: 50mM Tris-Cl (pH=7,6), 100mM NaCl, 2mM KCl, 10mM MgCl₂, 0,5mM DTT; 0,01% NP40, 200µg/mL DNaseI

Thrombin-Puffer: 50mM Tris-Cl (pH=7,6), 100mM NaCl, 0,5mM DTT

E2-Puffer: 50mM Tris-Cl (pH=7,6), 0,1mM EDTA, 0,5mM DTT

Mit pGEX-KG-E2-25K transformierte BL21(DE3)pLysS-Zellen wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde tags eine Vorkultur angelegt, indem 5mL 2xYT-Medium/Amp mit einem Klon der Ü.N.-Platte inokuliert und für 8 Stunden bei 37°C inkubiert wurden. Am darauf folgenden Tag wurden 50mL 2xYT/Amp mit 2,5mL der Kultur vom Vortag angeimpft und nach 4 Stunden Inkubation in eine Großkultur 2xYT/Amp von 1L überführt. Bei einer OD₆₀₀=0,6 erfolgte die Induktion der Expression des GST-E2-25K-Fusionsproteins mittels 0,4mM IPTG. Nach 3h wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und bei -70°C gelagert.

Das Zellpellet wurde in 30mL E2-Lysispuffer aufgenommen, resuspendiert und die Zellen durch wiederholtes Pipettieren und durch eine anschließende Ultraschallbehandlung von 4x 30sec aufgeschlossen. Der nach 30minütiger Zentrifugation bei 15000rpm erhaltene Überstand wurde mit 5mL in E2-Lysispuffer äquilibrierter GST-Bindungs-Matrix (GST-bind-resin) versetzt. Die Bindung des Proteins GST-E2-25K an die Matrix erfolgte für 2h bei 4°C auf dem Rollgerät. Die Matrix wurde 1x mit E2-Lysis-Puffer und 2x mit Thrombinpuffer gewaschen. Die Elution von E2-25K erfolgte bei 4°C ü.N. durch Inkubation der Matrix mit 10µL (10U) biotinyliertem Thrombin in 10mL Thrombinpuffer. Nach Zentrifugation wurde dem Überstand zur Bindung und Entfernung des biotin-Thrombins 1mL Streptavidin-Agarose zugegeben. Dieser Schritt wurde nach dem Pelletieren und Entfernen der biotin-Thrombin-gebundenen Agarose mit dem Überstand wiederholt. Es folgte eine Dialyse der E2-25K-enthaltenden Lösung gegen E2-Puffer bei 4°C ü.N. Das Enzym E2-25K wurde mittels Vivaspinsäulchen (4mL, MWCO=10kDa) auf 2,5mg/mL konzentriert und bei -70°C gelagert.

Die Überprüfung der Reinheit der Präparation erfolgte mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Auf diese Weise und durch Absorptionsmessung bei der Wellenlänge von 280nm (A₂₈₀=1 → c=1mg/mL) wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Zum Test der Aktivität des E2-Enzyms wurde die in Kapitel 2.2.2.3 aufgeführte Reaktion der Ubiquitin-Mutanten Ub-D77 und Ub-K48C zu Di-Ubiquitin in kleinem Maßstab, in 25µL Gesamtvolumen ausgeführt und analysiert.

2.2.2.2 Generierung von His-markierten Ub-Substrat-Fusionsproteinen

His-Lysis-Puffer: 20mM Tris-Cl (pH=7,5), 200mM NaCl, 0,5mM DTT, 0,1mM EDTA, 3fache Menge der empfehlenden Konzentration an EDTA-freiem Complete-Inhibitor-Mix (Roche)

His-Puffer: 20mM Tris-Cl, 200mM NaCl, pH=7,5

His/5-Puffer: His-Puffer mit 5mM Imidazol

His/50-Puffer: His-Puffer mit 50mM Imidazol

His/100-Puffer: His-Puffer mit 100mM Imidazol

His/300-Puffer: His-Puffer mit 300mM Imidazol

FPLC-Puffer: 50mM Tris-Cl (pH=7,5), 0,5mM EDTA, 0,5mM DTT, sterilfiltriert

Mit pET16-Ub(G/V)76-E7 bzw. pRSET-Ub-Muc_{4/8/long} transformierte HMS174(DE3)pLysS-Zellen wurden auf LB-Agarplatten/Amp ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Alle folgenden Kulturen enthielten zusätzlich zu LB/Amp 100mM Glukose, um einer vorzeitigen Expression der Fremdgene entgegenzuwirken. Analog zur Amplifikation der GST-E2-25K-enthaltenden BL21(DE3)-Kulturen (Kapitel 2.2.2.1) wurde auch von den transformierten HMS174(DE3)pLysS-Zellen an Tag1 eine 3mL-Vorkultur angelegt, die am folgenden Tag zum Animpfen einer 50mL und später 1L-Kultur verwendet wurde. Bei einer OD₆₀₀=0,6 erfolgte die Induktion der Expression des jeweiligen Fusionsproteins mittels 0,4mM IPTG. Nach 2h wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und bei -70°C gelagert.

Die Proteinisolierung erfolgte stringent bei 4°C. Das Zellpellet wurde in 30mL His-Lysispuffer aufgenommen und resuspendiert. Die Zelllyse wurde mittels dreier Läufe durch eine Frechpress durchgeführt. Der nach 30minütiger Zentrifugation bei 15000rpm erhaltene Überstand wurde auf eine Biorad-Säule (Ø=0,5mL) mit 1mL Ni²⁺-NTA-Matrix transferiert, die zuvor mit His/5-Puffer gewaschen worden war. Die beladene Matrix wurde 3x mit jeweils 0,5mL His/5- und His/50-Puffer gespült. Die Elution des Substrates erfolgte ebenfalls stufenweise durch Zugabe von jeweils 4x 0,5mL His/100- bzw. His/300-Puffer. 4µL jeden 0,5mL Eluats wurden einer SDS-

PAGE mit folgender Coomassie-Färbung unterzogen, die Substrat-enthaltenden Fraktionen vereinigt, mittels Vivaspin-Säulchen (4mL, MWCO=5kDa) auf 0,75mL eingengt, sterilfiltriert und einer Gelfiltrations-Chromatographie (Superdex 75 HR 10/30 in einer FPLC) zugeführt. Die Elution erfolgte mittels FPLC-Puffer. Nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung wurden die Substrat-enthaltenden Fraktionen vereinigt und über Vivaspin-Säulchen (4mL, MWCO=5kDa) auf 1mg/mL ankonzentriert. Die Lagerung der Konzentrate erfolgte bei -70°C.

2.2.2.3 Generierung von Tetra-Ubiquitin

Die Generierung von Tetra-Ubiquitin wurde auf Basis des Protokolls von Piotrowski *et al.* durchgeführt und hinsichtlich einer größeren Proteinmenge optimiert (Piotrowski *et al.*, 1997).

▪ Isolierung der Ubiquitin-Mutanten Ub-D77 bzw. Ub-K48C:

Ub-Lysis-Puffer: 50mM Tris-Cl (pH=7,6), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 0,02% NP40, Complete-Inhibitor-Mix (Roche), 200µg/ mL DNaseI

NH₄OAc-Puffer: 50mM NH₄OAc, Einstellung des pH-Wertes von 4,5 mit Essigsäure

NH₄OAc/500-Puffer: NH₄OAc mit 0,5M NaCl

Mit pET3a-D77 bzw. pET3a-K48C und jeweils pJY2 co-transformierte BL21(DE3)pLysS Zellen wurden auf LB-Agarplatten/Amp/CA ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Der Vektor pJY2 kodiert für die in *E. coli* seltener exprimierte tRNA_{UCU}^{Arg}. Durch co-Transformation dieses Vektors wird ein Fehleinbau von Lysin anstelle von Arginin verhindert. Analog zur Amplifikation der GST-E2-25K-enthaltenden BL21(DE3)-Kulturen (Kapitel 2.2.2.1) wurde auch in diesem Fall an Tag1 eine 3mL-Vorkultur angelegt, die am folgenden Tag zum Animpfen einer 50mL und später 1L-Kultur verwendet wurde. Bei einer OD₆₀₀=0,6 erfolgte die Induktion der Expression der jeweiligen Ub-Mutante mittels 0,4mM IPTG. Nach 4h wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und bei -70°C gelagert.

Das Zellpellet wurde in 25mL Ub-Lysis-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Die Zelllyse wurde durch wiederholtes Pipettieren und eine Ultraschallbehandlung (4x Puls von 30sec) komplettiert. Der nach 20minütiger Zentrifugation bei 10000rpm erhaltene Überstand wurde in ein Becherglas überführt. Durch Zugabe von 1 Volumenprozent Perchlor-Essigsäure (70%ig) zur Probe auf Eis wurden die meisten Proteine, nicht aber das stabile Ubiquitin, denaturiert. Durch erneute Zentrifugation wurden die säuredenaturierten Proteine pelletiert. Der Ubiquitin-enthaltende Überstand wurde bei 4°C und ü.N. gegen NH₄OAc-Puffer dialysiert. Es folgte eine Kationenaustauscher-Chromatographie. Der dialysierte Überstand wurde auf eine Biorad-Säule (Ø=1cm) mit 10mL SP-Sepharose FF transferiert, die zuvor in NH₄OAc-Puffer äquilibriert worden war. Die Ub-Spezies banden bei dem pH-Wert von 4,5 an die Matrix und konnten durch Zugabe des Hochsalzpuffers NH₄OAc/500 eluiert werden. Die Fraktionen wurden mit 1,5M Tris-Cl-Lösung (pH=10) neutralisiert und Aliquots mittels SDS-PAGE/Coomassie-Färbung analysiert. Die Ub-haltigen Fraktionen wurden vereinigt, ü.N. gegen 50mM Tris-Cl (pH=7,6) dialysiert, mittels Vivaspin-Säulchen (4mL, MWCO=5kDa) auf etwa 100mg/mL konzentriert und bei -70°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der Ub-Spezies erfolgte mittels SDS-PAGE/Coomassie-Färbung und durch Absorptionsmessung. Wegen des Ub-spezifischen Absorptionskoeffizienten gilt der folgende Zusammenhang: A₂₈₀=0,16 → c=1mg/mL.

▪ Synthese von Ub₂ durch Konjugation zwischen Ub-K48C und Ub-D77:

5x Synthese-Puffer: 250mM Tris-Cl (pH=8), 25mM MgCl₂, 50mM Kreatinphosphat, 3U/mL inorganische Pyrophosphatase, 3U/mL Kreatinkinase

Q-Puffer (frisch ansetzen): 50mM Tris-Cl (pH=7,6), 1mM EDTA, 5mM DTT

S-Puffer (frisch ansetzen): 50mM NH₄OAc (pH=4,5), 1mM EDTA, 5mM DTT

S/600-Puffer: S-Puffer + 0,6M NaCl

Für die Synthese von Di-Ubiquitin (Ub₂-K48C-D77) wurden die folgenden Komponenten in einem Reaktionsvolumen von 4mL eingesetzt: 1x Synthese-Puffer, 2mM ATP, 0,5mM DTT, 7,5mg/mL Ub-D77, 7,5mg/mL Ub-K48C, 0,5mg/mL E2-Enzym E2-25K. Die Reaktion wurde mit 0,1µM Ub-aktivierendem Enzym (E1) gestartet und erfolgte für 4h bei 37°C unter Schüttelbewegung. Nach Zugabe von 5mM DTT wurde der Reaktionsansatz auf eine Biorad-Säule (Ø<0,5cm) mit 0,5mL Q-Sepharose-FF-Matrix überführt, die zuvor mit Q-Puffer äquilibriert worden war. Während die Enzyme an den Anionenaustauscher banden, wurden die Ub-Spezies durch Waschen der beladenen Säule mit 4x 0,5mL Q-Puffer eluiert. Nach Ansäuern des Eluates mit 2N Essigsäure auf einen pH-Wert von 4,5 wurde die Ub-enthaltende Lösung auf eine Säule (Ø=1cm) mit 4mL SP-Sepharose FF gegeben, die mit S-Puffer äquilibriert worden war. Die Elution der Ub-Spezies erfolgte durch einen 160mL NaCl-Gradienten (0mM (S-Puffer) bis 600mM (S/600-Puffer)). Nach SDS-PAGE/Coomassie-

Färbung wurden die Ub₂-enthaltenden Fraktionen vereinigt, ü.N. gegen Q-Puffer dialysiert und die Proteine über Vivaspin-Säulchen (4mL, MWCO=5kDa) auf 60mg/mL ankonzentriert. Die Lagerung der Konzentrate erfolgte bei -70°C.

▪ Proximale Deblockierung durch Entfernung von D77 (Generierung von Ub₂-K48C):

Eine Hälfte des Di-Ubiquitins wurde mittels des Deubiquitinierungsenzyms UCH-L3 proximal deblockiert. Die Reaktion enthielt die folgenden Komponenten: 50mM Tris-Cl (pH=7,6), 1mM EDTA, 1mM DTT, 20mg Ub₂ und 20µg/mL UCH-L3. Die Reaktion wurde für 1h bei 37°C durchgeführt. Der Ansatz wurde anschließend über 0,5mL einer mit Q-Puffer äquilibrierten Q-Sepharose FF Matrix gegeben und das Ub₂ durch Zugabe von 4x 0,5mL Q-Puffer direkt in den Vivaspin-Konzentrator eluiert. Die Probe wurde auf ein Volumen von 0,2mL konzentriert.

▪ Distale Deblockierung durch Modifikation des C48 (Generierung von Ub₂-D77):

Die andere Hälfte des Di-Ubiquitins wurde distal deblockiert, indem durch Alkylierung des C48 mittels Ethylenimin (EI) eine Lysin-ähnliche Aminosäurestruktur erzeugt wurde. Der Reaktionsansatz war – wie folgt – zusammengesetzt: 150mM Tris-Cl (pH=8), 1mM EDTA, 20mg Ub₂, 55mM EI. Nach Inkubation für 1h bei 37°C wurde die Probe gegen 10mM Tris-Cl (pH=8) ü.N. bei 4°C dialysiert und auf 200µL ankonzentriert.

▪ Synthese von Ub₄ durch Konjugation zwischen Ub₂-K48C und Ub₂-D77:

Die Synthese von Tetra-Ubiquitin durch Konjugation zwischen Ub₂-K48C und Ub₂-D77 erfolgte analog zu der Generierung von Di-Ubiquitin aus den Ub-Monomeren. Die folgenden Parameter wurden an die Ub₄-Synthesereaktion angepasst: Es wurden 10mg/mL jeden Dimers in die Reaktion eingesetzt. Die Synthesereaktion erfolgte 2h bei 37°C. Die Elution der Ub-Spezies von der Kationenaustauscher-Säule wurde mittels eines 160mL NaCl-Gradienten (0mM (S-Puffer) bis 700mM (S/700-Puffer)) ausgeführt.

Nach Neutralisation und Analyse der Proben mittels SDS-PAGE/Coomassie-Färbung wurden die Ub₄-enthaltenden Fraktionen vereinigt und ü.N. gegen Q-Puffer dialysiert. Die Ankonzentrierung erfolgte über Vivaspin-Säulchen (4mL, MWCO=5kDa). Die Konzentrate wurden bei -70°C.

2.2.2.4 Konjugation der Fusionsproteine mit Tetra-Ubiquitin

▪ Proximale Deblockierung von Tetra-Ubiquitin durch Entfernung von D77:

Die Deblockierungsreaktion enthielt die folgenden Komponenten: 50mM Tris-Cl (pH=7,6), 1mM EDTA, 1mM DTT, 10mg Ub₄ und 25µg/mL UCH-L3. Die Reaktion wurde für 1h bei 37°C durchgeführt. Der Ansatz wurde anschließend über 0,5mL einer mit Q-Puffer äquilibrierten Q-Sepharose FF Matrix gegeben und das Ub₄ durch Zugabe von 4x 0,5mL Q-Puffer direkt in den Vivaspin-Konzentrator eluiert. Die Probe wurde auf ein Volumen von 0,3mL konzentriert.

▪ Konjugation von Tetra-Ubiquitin an Ubiquitin-Substrat-Fusionsproteine:

5x Synthese-Puffer: 250mM Tris-Cl (pH=8), 25mM MgCl₂, 50mM Kreatinphosphat, 3U/mL inorganische Pyrophosphatase, 3U/mL Kreatinkinase

Q-Puffer (frisch ansetzen): 50mM Tris-Cl (pH=7,6), 1mM EDTA, 5mM DTT

S-Puffer (frisch ansetzen): 50mM NH₄OAc (pH=4,5), 1mM EDTA, 5mM DTT

S/600-Puffer: S-Puffer + 0,6M NaCl

Zur Konjugation wurden die folgenden Komponenten in einem Reaktionsvolumen von 2,5mL eingesetzt: 1x Synthese-Puffer, 2mM ATP, 0,1mM DTT, 0,5mg Fusionsprotein, 4mg deblockiertes Ub₄, 1mg E2-25K. Die Reaktion wurde mit 12µg Ub-aktivierendem Enzym (E1) gestartet und erfolgte ü.N. bei 37°C unter einer Schüttelbewegung. Nach der Inkubation wurden 5mM DTT zugegeben.

▪ Reinigung der penta-ubiquitinierten His-markierten Substrate:

His-Lysis-Puffer: 20mM Tris-Cl (pH=7,5), 200mM NaCl, 0,5mM DTT, 0,1mM EDTA, 3fache Menge der empfohlenen Konzentration an Protease-Inhibitor-Cocktail

His-Puffer: 20mM Tris-Cl, 200mM NaCl, pH=7,5

His/5-Puffer: His-Puffer mit 5mM Imidazol

His/50-Puffer: His-Puffer mit 50mM Imidazol

His/100-Puffer: His-Puffer mit 100mM Imidazol

His/300-Puffer: His-Puffer mit 300mM Imidazol

FPLC-Puffer: 50mM Tris-Cl (pH=7,5), 0,5mM EDTA, 0,5mM DTT, sterilfiltriert

Zur Reinigung der penta-ubiquitinierten His-markierten Substrate wurden die nach der Konjugation erhaltenen und mit DTT-behandelten Reaktionen auf eine Biorad-Säule ($\varnothing=0,5\text{mL}$) mit $0,75\text{mL Ni}^{2+}$ -NTA-Matrix transferiert, die zuvor mit His/5-Puffer gewaschen worden war. Die beladene Matrix wurde 3x mit jeweils $0,5\text{mL His/5-}$ bzw. His/50-Puffer gespült. Die Elution des Substrates erfolgte ebenfalls stufenweise durch Zugabe von jeweils 4x $0,5\text{mL His/100-}$ bzw. His/300-Puffer. $4\mu\text{L}$ jeden $0,5\text{mL}$ Eluats wurden einer SDS-PAGE mit folgender Coomassie-Färbung unterzogen, die Substrat-enthaltenden Fraktionen vereinigt, mittels Vivaspin-Säulchen (4mL , MWCO=5kDa) auf $0,5\text{mL}$ eingengt, sterilfiltriert und einem zweiten Reinigungsschritt, einer Gelfiltrations-Chromatographie mit einer Superdex 75 HR 10/30 Säule in der FPLC zugeführt. Die Elution wurde mittels FPLC-Puffer vorgenommen und 1mL Fraktionen gesammelt. Nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung wurden die Substrat-enthaltenden Fraktionen vereinigt und über Vivaspin-Säulchen auf 1mg/mL ankonzentriert. Die Lagerung der Konzentrate erfolgte bei -70°C .

2.2.3 Isolierung von Proteinkomplexen aus Erythrozyten

2.2.3.1 Isolierung von 26S Proteasomen

PBS: 8g NaCl , $0,2\text{g KCl}$, $1,48\text{g Na}_2\text{HPO}_4$, $0,24\text{g K}_2\text{HPO}_4$, ad $1\text{L dH}_2\text{O}$, $\text{pH}=7,5$

10x TS-ATP: 100mM Tris-Cl , 250mM KCl , 100mM NaCl , 11mM MgCl_2 , 1mM EDTA , 10mM NaN_3 , 20mM ATP , $\text{pH}=7$

TSDG-Puffer (frisch ansetzen): 1x TS-ATP mit 1mM DTT , 10% Glycerol, $\text{pH}=7$

TSDG/75-Puffer: TSDG mit 75mM KCl

TSDG/400-Puffer: TSDG mit 400mM KCl

TSDG/300-Puffer: TSDG mit 300mM KCl

Die Präparation erfolgte nach Hough *et al.* bzw. Dahlmann *et al.* und wurde bei 4°C ausgeführt (Dahlmann *et al.*, 1995; Hough *et al.*, 1987).

- Zelllyse: Humane Erythrozyten aus einer Erythrozytenkonserve wurden 3mal in PBS mit 2mM ATP gewaschen. Der Zellaufschluss mittels hypotoner Lyse erfolgte nach Aufnahme des Erythrozyten-Pellets in $700\text{mL dH}_2\text{O}$ mit $1,5\text{mM DTT}$ durch Rühren für 1h . Der nach Zentrifugation (1h , 13000g , Beckman JA14) erhaltene Überstand von etwa 700mL wurde mit 80mL 10xTS-ATP und 80mL Glycerol versetzt.

- DEAE-Toyopearl-Chromatographie: Zu dem gepufferten Überstand wurden 60mL einer in TSDG äquilibrierten DEAE-Toyopearl-Suspension (50% Matrix, 50% TSDG) gegeben und im *batch*-Verfahren für $1,5\text{h}$ unter steter Bewegung inkubiert. Proteasomkomplexe binden an das positiv geladene Säulenmaterial und lassen sich mittels eines Salzgradienten eluieren. Die beladene Matrix wurde in einen Büchnertrichter überführt, der mit mehreren Lagen Filtergewebe mit einer Porengröße von $20\mu\text{m}$ ausgekleidet war. Das Toyopearl-Material wurde solange mit TSDG gewaschen, bis die durch das Hämoglobin verursachte rote Färbung verschwunden war. Darauf folgend wurde die Matrix in eine Chromatographie-Säule ($V=30\text{mL}$, $\varnothing=2\text{cm}$) überführt und mit 10 Säulenvolumen an TSDG/75-Puffer gewaschen. Die Elution wurde mittels eines linearen 350mL KCl -Gradienten (75mM (TSDG/75-Puffer) bis 400mM (TSDG/400-Puffer)) durchgeführt. Die Fraktionen á 2mL -Volumen wurden hinsichtlich ihrer peptidspaltenden Aktivität getestet (Kapitel 2.2.4.8). Für die 26S Präparation wurde nur die Fraktionen verwendet, die – für 26S typisch – eine hohe Suc-LLVY-AMC-spaltende Aktivität aufwiesen und nur eine minimale Z-GGL-AMC-spaltende Aktivität (Marker für 20S Proteasomen) bzw. H-AAF-AMC-spaltende Aktivität (Hinweis auf TPPII) zeigten. Fraktionen mit hoher Z-GGL-AMC-spaltende Aktivität wurden für die 20S Präparation weiterverwendet (Kapitel 2.2.3.2.). Die 26S-enthaltenden Proben wurden vereinigt und ü.N. gegen TSDG dialysiert. Die Proteinkomplexe des Dialysats wurde mittels Ultrazentrifugation (Beckman Ti70) für 22h bei 35000rpm ($=100000\text{g}$) pelletiert und in 2mL TSDG resuspendiert.

- Gelfiltration mit Sepharose 6B: Mittels Gelfiltration ist eine Separierung von Proteinkomplexen aufgrund ihrer unterschiedlichen Komplexgröße möglich. Eine Sepharose 6B-Säule ($V=250\text{mL}$, $\varnothing=2\text{cm}$) wurde mit der Proteasom-haltigen Probe bestückt. Die Protein-elution erfolgte im *free flow*-Verfahren mittels 100mL TSDG-Puffer. Die Fraktionen á $1,5\text{mL}$ Volumen wurden analog zur DEAE-Toyopearl-Chromatographie hinsichtlich ihrer peptidspaltenden Aktivität getestet. Die Proben mit hoher Suc-LLVY-AMC-spaltender Aktivität wurden vereinigt und einer Anionenaustauscher-Chromatographie mittels Arginin-Sepharose unterzogen.

- Arginin-Sepharose-4B-Chromatographie (V=14mL, Ø= 1,5): Die Matrix wurde nach der Beladung mit der Proteasom-enhaltenden Probe mit 10 Säulenvolumen TSDG-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen 500mL KCl-Gradienten (25mM (TSDG-Puffer) bis 400mM (TSDG/400-Puffer)). Die Fraktionen á 3mL wurden auf ihre peptidspaltende Aktivität geprüft und die Proben mit hoher Suc-LLVY-AMC-spaltender Aktivität vereinigt und gegen TSDG dialysiert. Die Proteasomkomplexe wurde mittels Ultrazentrifugation (22h, 35000rpm, Rotor Ti70) pelletiert und in 1,5mL TSDG resuspendiert. Die Probe wurde auf Eis gelagert und alle Analysen innerhalb von 14 Tagen nach Präparation durchgeführt.

2.2.3.2 Isolierung von 20S Proteasomen

TEAD-Puffer: 20mM Tris-Cl, pH=7,2, 1mM EDTA, 1mM NaN₃, 1mM DTT

TEAD/50-Puffer: TEAD-Puffer mit 50mM NaCl

FPLC-Puffer/100: TEAD-Puffer mit 100mM NaCl, sterilfiltriert

FPLC-Puffer/1M: TEAD-Puffer mit 1M NaCl, sterilfiltriert

Die Präparation erfolgte nach Groettrup *et al.* und wurde bei 4°C ausgeführt (Groettrup *et al.*, 1995). Die während der 26S Präparation nach Anionenaustauscher-Chromatographie mit DEAE-Toyopearl erhaltenen Fraktionen mit hoher Z-GGL-AMC-spaltender Aktivität (Kapitel 2.2.3.1) wurden zur Präparation von 20S Proteasomen verwendet. Die Proben wurden vereinigt und einer Ammoniumsulfat-Fraktionierung unterzogen.

- (NH₄)₂SO₄-Fraktionierung: Im ersten Fällungsschritt erfolgte durch die Zugabe von (NH₄)₂SO₄ bis zu einer 35%igen Sättigung zur Probe die Fällung nicht proteasomaler Proteine. Während der Salzzugabe wurde die Probe auf Eis gehalten und stetig gerührt. Der nach Zentrifugation (15min, 15000rpm, Beckman JA25,5) erhaltene Überstand wurde einem zweiten Fällungsschritt unterzogen, bei dem (NH₄)₂SO₄ bis zu einer Sättigung von 75% zugegeben wurde und unter Rühren für 20min zur Präzipitation des Proteasoms führte. Das nach Zentrifugation entstandene Pellet wurde in 0,75mL TEAD/50-Puffer gelöst und einer Saccharose-Gradienten-Zentrifugation zugeführt.

- Saccharosegradienten-Zentrifugation: Es wurde in Polyallomer-Röhrchen für die Ultrazentrifugation ein Saccharosegradient aus 6,5mL 10% Saccharose in TEAD/50-Puffer und 6,5mL 40% Saccharose in TEAD/50-Puffer hergestellt und mit 1mL Probe überschichtet. Die Zentrifugation (UZ, Beckman SW40) wurde für 16h bei 40000rpm durchgeführt. Die durch Fraktionierung (á 1mL) gewonnenen Proben wurden auf peptidspaltende Aktivität (Kapitel 2.2.4.8) getestet. Die Proben mit hoher enzymatischer Aktivität wurden ü.N. gegen TEAD dialysiert und mittels Mono-Q-Anionenaustauscher-Chromatographie aufgetrennt.

- Mono-Q-Chromatographie (FPLC): Die Proteinlösung wurde sterilfiltriert und chromatographisch aufgetrennt: Eine in FPLC-Puffer/100 äquilibrierte MonoQ-Säule wurde mit der Probe beladen, mit 5 Säulenvolumen FPLC-Puffer/100 gewaschen und das Proteasom mittels eines linearen 20mL NaCl-Gradienten (300mM bis 500mM (FPLC-Puffer/1M)) in TEAD bei einer Flussrate von 1mL/min eluiert. Die 1mL Fraktionen wurden einem Aktivitätstest unterzogen und Proben mit hoher enzymatischer Aktivität für die Analyse auf Eis gelagert.

2.2.3.3 Isolierung von Fraktion II

10x TS-ATP: 100mM Tris-Cl, 250mM KCl, 100mM NaCl, 11mM MgCl₂, 1mM EDTA, 10mM NaN₃, 20mM ATP, pH=7

TSDG-Puffer (frisch ansetzen): 1x TS-ATP mit 1mM DTT, 10% Glycerol, pH=7

TSDG/500-Puffer: TSDG mit 0,5M KCl

Die Gewinnung von Fraktion II erfolgte in Anlehnung an Hershko *et al.* (Hershko *et al.*, 1983). 20mL des nach hypotoner Lyse erhaltenen Erythrozytenlysats (siehe Kapitel 2.2.3.1) wurden zur Pelletierung der Zellrümmen für 1h bei 15000rpm zentrifugiert, der Überstand mit einem Zehntel Volumen an 10x TS-ATP und Glycerol versetzt und für 1,5h im *batch* mit 10mL TSDG-äquilibrierter DEAE-Toyopearl-Matrix inkubiert. Das Säulenmaterial wurde mit 10 Säulenvolumen TSDG gewaschen und die adsorbierten Proteine mit 2,5 Säulenvolumen TSDG/500-Puffer eluiert. Es folgte eine Ammoniumsulfat-Präzipitation bei 90%iger Sättigung. Das nach Zentrifugation erhaltene Pellet wurde in 2mL TSDG-Puffer aufgenommen und ü.N. gegen TSDG-Puffer dialysiert. Die Proben wurden bei -70°C aufbewahrt.

2.2.3.4 Isolierung von PA28

Phosphat/10-Puffer: 10mM Phosphat, pH=7

Phosphat/100-Puffer: 100mM Phosphat, pH=7, filtriert

Phosphat/250-Puffer: 250mM Phosphat, pH=7, filtriert

TEAD-Puffer: 20mM Tris-Cl, pH=7,2, 1mM EDTA, 1mM NaN₃, 1mM DTT

Die Isolierung von PA28 aus humanen Erythrozyten wurde von B. Dahlmann (Institut für Biochemie, CCM, Berlin) vorgenommen und erfolgte nach dem Protokoll aus Kühn *et al.* (Kuehn & Dahlmann, 1996). Zusätzlich wurde nach dem dritten Reinigungsschritt (einer DEAE-Cellulose-Chromatographie) eine Chromatographie mittels Hydroxyl-Apatit durchgeführt.

Die mit Phosphat/10-Puffer äquilibrierte Hydroxyl-Apatit-Säule (Ø=2mL, V=10mL bio-Gel HTP von Biorad) wurde mit den aus der DEAE-Cellulose-Chromatographie gewonnenen PA28-enthaltenden und vereinigten Fraktionen beladen und mit Phosphat/100-Puffer gewaschen, bis kein Protein mehr nachweisbar war. Die Elution erfolgte mit einem linearen 100mL Phosphat-Gradienten (100mM (Phosphat/100-Puffer) bis 150mM (Phosphat/250-Puffer)). Es wurden 2mL Fraktionen gesammelt und auf PA28-vermittelte Proteasomaktivierung getestet. Die PA28-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und gegen TEAD-Puffer dialysiert. Es folgten Chromatographien mittels Mono-Q-HR 5/5- und Phenyl-Superose HR 5/5-Säule. Die PA28-enthaltenden Fraktionen wurden gegen TEAD-Puffer dialysiert. Die Reinheit der PA28-Komplexe wurde mittels SDS-PAGE/Coomassie-Färbung überprüft und der proteasomaktivierende Effekt mit Hilfe des fluorogenen Substrates Suc-LLVY-AMC bestätigt. Den Proben wurde zur Komplexstabilisierung Glycerol bis zu einem Anteil von 50% zugegeben. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.2.3.5 Rekonstitution von 20S-PA28-Komplexen bzw. Hybridproteasomen

Rekonstitutionspuffer: 50mM Tris-Cl, pH=7,2, 5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,5mM DTT; 2,5% Glycerol

Die *in vitro* Rekonstitution von 20S-PA28-Komplexen bzw. Hybridproteasomen erfolgte bei 37°C durch 15minütige Inkubation von isolierten 20S-Komplexen mit isoliertem PA28 in einem molaren Verhältnis von 1:2 in Rekonstitutionspuffer und im Fall von 26S Proteasomen mit PA28 in einem Verhältnis von 1:3 in Rekonstitutionspuffer mit 2mM ATP. Die molaren Verhältnisse wurden so gewählt, um eine bestmögliche Abdeckung aller potentiellen proteasomalen PA28-Bindungsstellen zu gewähren. Für die Aktivitätstests, die Nativ-PAGE bzw. die *in vitro* Prozessierung ubiquitinierten Modellsubstrate wurden 8µg 20S Proteasom mit 4,26µg PA28 bzw. 8µg 26S Proteasom mit 1,92µg PA28 in 50µL (für Nativ-PAGE) bzw. 100µL (für Aktivitätstest und Degradationsansatz) inkubiert. Der Degradationsansatz mit dem 26S Proteasom wurde vor dem Reaktionsstart mit dem ATP-regenerierenden System komplettiert (5mM Kreatinphosphat, 0,6U/mL Kreatinkinase).

2.2.3.6 Isolierung des COP9-Signalosoms (CSN)

Der CSN-Komplex wurde von B. Hetfeld (Klinik für Expt. Chirurgie und Molekularbiologie, CCM, Berlin) zur Verfügung gestellt. Er wurde gemäß Hetfeld *et al.* isoliert (Hetfeld *et al.*, 2005a).

2.2.4 Proteinanalyse

2.2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung bei λ=280nm. Eine Absorption von 1 entspricht in etwa einer Proteinkonzentration von 1mg/mL. Zur Bestätigung der spektralphotometrisch ermittelten Proteinkonzentration wurde die Proteinmenge mittels SDS-PAGE/Coomassie-Färbung und im Vergleich zu einem Referenzprotein mit definierter Konzentration analysiert.

2.2.4.2 Ethanolfällung von Proteinen

Die Proben wurden mit 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt und für 1h bei -70°C inkubiert. Das präzipitierte Protein wurde durch Zentrifugation für 30min bei 4°C pelletiert und zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 20µL 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und SDS-gelelektrophoretisch analysiert.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

10x SDS-Probenpuffer: 5mL Glycerol, 1g SDS, 5mL 1M Tris-Cl, pH=6,8, Spatelspitze Bromphenolblau, 200mM DTT

Acrylamidlösung: 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid, w/v

4x Sammelgel-Puffer: 0,5M Tris-Cl, pH=6,8, 0,4% SDS w/v

4x Trenngel-Puffer: 1,5M Tris-Cl, pH=8,8, 0,4% SDS w/v

10x Elektrophorese-Puffer: 144g Glycin, 30g Tris-Base

→Elektrophoresepuffer: 1x Elektrophorese-Puffer mit 0,1% SDS

Trenngel (15% bzw. 17,5%): 10mL bzw. 11,7mL 30% Acrylamidlösung, 5mL 4x Trenngelpuffer, 5mL bzw. 3,3mL H₂O, 80μL 10% APS, 80μL TEMED

Sammelgel (4,5%): 1,5mL 30% Acrylamidlösung, 2,5mL 4x Sammelgelpuffer, 6mL H₂O, 80μL 10% APS, 80μL TEMED

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte nach dem Protokoll von Lämmli et al. (Laemmli, 1970). Die Proben wurden mit 10x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5min bei 95°C erhitzt. Es wurden 2,5μg monomerer Proteine, 15μg Proteinkomplexe bzw. 50μg Lysat analysiert.

2.2.4.4 Nativ-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und fluorogener Peptid-overlay

▪ Nativ-PAGE:

5x Nativ-Puffer: 0,45M Tris-Base, 0,45M Borsäure, 10mM MgCl₂,

→Nativ-Puffer: 1x Nativ-Puffer mit 1mM ATP, 1mM DTT

5x Nativ-Probenpuffer: Spatelspitze Xylencyanol in 50% Glycerol

4%iges Polyacrylamidgel: 3mL 5x Nativ-Puffer, 2mL 30% Acrylamidlösung, 0,75mL Glycerol, 1mM ATP, 1mM DTT, 120μL 10% APS, 12μL TEMED, ad 15mL dH₂O

Die Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach Glickman *et al.* unter Verwendung eines 4%igen Polyacrylamidgels durchgeführt (Glickman *et al.*, 1998b). Es wurden 7,5-12,5μg isolierte Proteasomen mit 1x Nativ-Probenpuffer versetzt und bei 4°C, 75V für 1h und darauf folgend bei 125V für etwa 2,5h gelelektrophoretisch aufgetrennt, bis die Xylencyanol-Bande aus dem Gel herausgelaufen war. Das Gel wurde einem fluorogenen Peptid -overlay und einer Coomassie-Färbung unterzogen.

▪ Gradienten-Nativ-PAGE:

5x Nativ-Puffer: 0,45M Tris-Base, 0,45M Borsäure, 10mM MgCl₂,

→Nativ-Puffer: 1x Nativ-Puffer mit 1mM ATP, 1mM DTT

5x Nativ-Probenpuffer: Spatelspitze Xylencyanol in 50% Glycerol

5% Polyacrylamidlösung: 1,1mL 5x Nativ-Puffer, 1,91mL dH₂O, 1,5mL Glycerol, 0,92mL 30% Acrylamid-lösung, 55μL 0,1M ATP, 11μL 0,5M DTT, 30μL 10% APS, 3μL TEMED

3,5% Polyacrylamidlösung: 1,1mL 5x Nativ-Puffer, 3,69mL H₂O, 0,64mL 30% Acrylamidlösung, 55μL 0,1M ATP, 11μL 0,5M DTT, 30μL 10% APS, 3μL TEMED

Es wurde ein Gradienten-Gel (Mini-Protean-Gelsystem) aus 5,5mL einer 5%igen und 5,5mL einer 3,5%igen Polyacrylamidlösung hergestellt. Es wurden 7,5-12,5μg isolierte Proteasomen mit 1x Nativ-Probenpuffer versetzt und bei 4°C für zunächst 75V für 1h und darauf folgend bei 125V für etwa 6h gelelektrophoretisch aufgetrennt, bis die Xylencyanol-Bande aus dem Gel herausgelaufen war. Das Gel wurde einem fluorogenen Peptid -overlay und einer Coomassie-Färbung unterzogen.

▪ fluorogener Peptid-overlay:

overlay-Puffer: 20mM Tris-Cl, pH=7,5, 5mM MgCl₂, 1mM ATP, 1mM DTT, 100μM fluorogenes Peptidsubstrat
Das Gel wurde auf eine UV-durchlässige Folie transferiert, die als Träger-Folie genutzt wurde, um ein Reißen des fragilen Gels zu verhindern. Das Gel wurde für 15min bei 37°C in 20mL overlay-Puffer inkubiert und auf einem UV-Schirm analysiert.

2.2.4.5 Western Blot

- Elektrottransfer von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran:

Anodenpuffer I: 0,3M Tris, 20% Methanol

Anodenpuffer II: 25mM Tris, 20% Methanol

Kathodenpuffer: 40mM 6-Aminohexansäure, 0,01 SDS, 20% Methanol

Amidoschwarz-Lösung: 0,02% Amidoschwarz, 9% Methanol, 2% Essigsäure

Der elektrophoretische Proteintransfer auf eine zuvor in Methanol getränkte PVDF-Membran erfolgte in dem diskontinuierlichen *semi-dry*-Verfahren. Der Transfer war in folgender Reihenfolge aufgebaut: Kathodenplatte, 2x Whatman in Kathodenpuffer, Gel, PVDF-Membran in Anodenpuffer II, 2x Whatman in Anodenpuffer II, 2x Whatman in Anodenpuffer I, Anodenplatte. Der Proteintransfer wurde für 1h bei 400mA durchgeführt und anschließend überprüft durch eine Proteinfärbung auf der Membran mittels Amidoschwarz-Lösung. Das Entfärben erfolgte mit Wasser.

- Identifizierung von Proteinen mittels Immunodetektion:

PBS: 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,48g Na₂HPO₄, 0,24g K₂HPO₄, ad 1L dH₂O, pH=7,5

Wasch- und Antikörper-Verdünnungslösung: PBS mit 0,4% Tween-20

Blocklösung: aus dem Kit BM Chemoluminescence Blotting Substrat (POD), Roche

ECL-Reagenzien: aus dem Kit BM Chemoluminescence Blotting Substrat (POD), Roche

Zum Absättigen der Membran wurde die PVDF-Membran ü.N. bei 4°C in Blocklösung inkubiert. Die Bindung des Erst-Antikörpers zur Detektion der rekombinanten Proteine erfolgte für 1h bei RT, zur Detektion von Proteinen aus Lysaten bzw. Proteinkomplexen ü.N. bei 4°C. Die Membran wurde 4x für 10min in Waschlösung gewaschen und anschließend für 1h, bei RT mit dem POD-gekoppelten Zweit-Antikörper inkubiert. Nach vier Waschschritten erfolgte die Signaldetektion mit dem Kit BM Chemoluminescence Blotting Substrat (POD), Roche nach dem Protokoll des Herstellers.

Die verwendeten Antikörper-Konzentrationen sind im Kapitel 2.1.7. angegeben.

2.2.4.6 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Färbelösung: 0,3% Serva Blue R250, 40% Methanol, 10% Essigsäure; Lösen des Farbstoffs ü.N. und Filtrieren der Lösung durch Whatman 3MM-Papier

Entfärbelösung: 40% Methanol, 10% Essigsäure

Die zu färbenden Polyacrylamidgele wurden für 30min in der Färbelösung inkubiert und anschließend etwa 1h entfärbt, bis der Hintergrund frei von Farbstoff war.

2.2.4.7 Densitometrische Auswertung Coomassie-gefärbter Polyacrylamidgele

Die densitometrische Auswertung der Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgele zur Proteinquantifizierung erfolgte nach dem *scannen* der Gele mit dem Computerprogramm Image J, NIH. Die Auswertung wurde gemäß der Anleitung des Programmierers vorgenommen (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

2.2.4.8 Aktivitätstest mittels fluorogener Peptide

Die verwendeten fluorogenen Peptidsubstrate wurden in DMF gelöst, in einer Stock-Konzentration von 10mM.

- Bestimmung der peptidspaltenden Aktivität des 26S Proteasoms

26S Test-Puffer: 20mM Tris-Cl, pH=7,5, 5mM MgCl₂, 10mM KCl, 2mM ATP, 1mM DTT, 50µM fluorogenes Peptidsubstrat (Suc-LLVY-AMC→ChT-L-Aktivität, Z-GGL-AMC→BrAAP-Aktivität, H-AAF-AMC→ChT-L-Aktivität sowie Spaltung durch TPPII, Z-LLE-AMC→PGPH-Aktivität, Bz-VGR-AMC→T-L-Aktivität).

Während der 26S Proteasom-Isolierung wurden zur Bestimmung der 26S-enthaltenden Fraktionen 10µL jeder Fraktion in einer Mikrotiterplatte mit jeweils 200µL Test-Puffer für 15min bei 37°C inkubiert. Die Freisetzung der fluorogenen Gruppe AMC durch proteasomale Peptidspaltung führte nach Anregung durch Licht der Wellenlänge $\lambda=390$ zur Emission von Licht der Wellenlänge $\lambda=460$, das mittels des Fluorometer BioTek Synergy HAT, BioTec detektiert wurde. Es war eine Sensitivität von 30 eingestellt.

In Kapitel 2.2.4.11 ist angegeben, wie mittels Aktivitätstests der Einfluss von Proteinsubstraten auf die peptidspaltende Fähigkeit des 26S Proteasoms ermittelt wurde.

- Bestimmung der peptidsaltenden Aktivität des 20S Proteasoms

TEAD-Puffer: 20mM Tris-Cl, pH=7,2, 1mM EDTA, 1mM NaN₃, 1mM DTT

20S Test-Puffer: TEAD-Puffer mit 50µM fluorogenem Peptidsubstrat

Die Analyse wurde mit 20S Test-Puffer und nach 30minütiger Inkubation bei 37°C mit den angegebenen Peptidsubstraten durchgeführt, erfolgte ansonsten aber analog zu den Ansätzen mit dem 26S Proteasom.

2.2.4.9 *In vitro* Degradation von ubiquitinierten Modells substraten durch das Proteasom

26S Verdau-Puffer: 50mM Tris-Cl, pH=7,2, 5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,5mM DTT, 2,5% Glycerol, 2mM ATP, 5mM Kreatinphosphat, 0,6U/mL Kreatinkinase

20S Verdau-Puffer: TEAD-Puffer (20mM Tris-Cl, pH=7,2, 1mM EDTA, 1mM NaN₃, 1mM DTT)

Wenn nicht anders angegeben, wurden in einem 100µL Degradationsansatz 26S Proteasomen (8µg) mit dem entsprechenden Substrat (Ub₅(G/V)-E7:1,56µg, Ub(G/V)-E7:0,57µg, Ub₅-MUC₄:1,32µg, Ub-MUC₄:0,42µg, Ub₅-MUC₈/Ub₅-MUC_{long}: 1,44µg) in einem molaren Verhältnis von 1:10, also in Konzentrationen von 30nM zu 300nM eingesetzt. Die *in vitro* Degradation erfolgte für 15min bzw. wie angegeben bei 37°C. Die Degradation durch das 20S Proteasom (2,4µg) erfolgte in TEAD-Puffer für 1h bzw. bis zum angegebenen Zeitpunkt und ebenfalls im Verhältnis 30nM Proteasom zu 300nM Substrat. Für die Inhibitionsexperimente wurde das Proteasom für 15min bei 37°C mit dem jeweiligen Inhibitor in den angegebenen Konzentrationen vorinkubiert. Für die Folge-Analysen mittels Western Blots wurden dem Degradationsansatz zu den entsprechenden Zeitpunkten 20µL entnommen, mit 10x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5min bei 95°C erhitzt und bis zur SDS-PAGE bei -20°C gelagert. Für die massenspektrometrische Analyse wurden entsprechend größere Degradationsvolumina angesetzt und 50µL pro Zeitpunkt entnommen. Diese Proben wurden sofort mit 20%iger TFA-Lösung versetzt, um eine finale Konzentration von 0,7% TFA zu erhalten und die Reaktion zu stoppen.

2.2.4.10 Massenspektrometrische Analyse der Prozessierungsprodukte

Die massenspektrometrischen Messungen erfolgten durch K. Janek (Institut für Biochemie, CCM, Berlin).

- HPLC-MALDI-MS

Mit TFA (final 0,7%) versetzte 50µL eines Degradationsansatzes wurden mittels TopTip Poros R-2, 1-10µL Säulchen entsalzt. Die Separation der Peptidgemische erfolgte mittels *Reversed Phase* Chromatographie an einer Nano-HPLC (Ultimate, Dionex-LC Packings) gekoppelt an einen MALDI-Spot-Roboter (Probot, Dionex). Es wurden eine 0.3 x 5mm Vorsäule zur Probenaufkonzentrierung und eine 0.075 x 150mm analytische Säule (jeweils PepMap C18, 3µm, Dionex-LC Packings) verwendet. Der Fluß betrug 200nL/min. Zur Elution wurde folgender binärer Gradient genutzt: 0-20% B in 5min, 20-55% B in 70min, 55-95% B in 2min, 95% B 8min (Eluent A: 0.05% TFA in 2% ACN/98% Wasser; Eluent B: 0.045% TFA in and 80% ACN/20% Wasser). Der Säulenfluß wurde kontinuierlich mit MALDI-Matrix (5mg/ml CHCA 1µl/min) gemischt und auf ein MALDI-Stahl-target im Intervall von 10sec im Areal von 26 x 12 Fraktionen gespottet.

Die MALDI-MS-Untersuchungen wurden an einem MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems) durchgeführt. Für die MS-Spektren wurden 1200 Laserschüsse pro Spot aufgezeichnet und mittels *default* Kalibrierung prozessiert. Die Prekursorselektion für die MS/MS-Spektren wurde automatisch durchgeführt (S/N: 40, maximal 5 MS/MS-Spektren/Spot). Die MS/MS-Spektren wurden mit Luft als Kollisionsgas bei einer Energie von 1keV und unter Verwendung von Stopkriterien (2500 to 10000 Laserschüsse/Spot) aufgenommen. Zur Datenanalyse wurde die Software GPS Explorer v3.5 (Applied Biosystems) mit Mascot v1.9 mit folgenden Suchkriterien verwendet: MS/MS *peak filtering* mit S/N <5, eingeschränkte Datenbank: nur Mucin-Substrate, ohne Enzym, 100 ppm Prekursor-Massentoleranz, signifikante Mascot Scores p<0.01. TFA: Trifluor-Essigsäure, ACN: Acetonitril, CHCA: α-Cyano-4-Hydroxycimtsäure.

- MALDI-MS

Mit TFA (final 0,7%) versetzte 50µL eines Degradationsansatzes wurden wie o.g. entsalzt. Die Proben wurden getrocknet und in 1µL ACN/Wasser (3:7, v/v), 0,1% TFA gelöst. Anschließend wurden 0,2µL Probe mit 0,5µL Matrix (CHCA [5mg/mL in ACN/Wasser (1:1, v/v), 0,3% TFA] und DHB [40mg/mL in ACN/Wasser (1:2, v/v), 0,5% TFA] gemischt und auf das MALDI-target aufgetragen. Die Messungen wurden an einem MALDI-TOF/TOF (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) in linearem bzw. Reflektor-Modus wie o.g. durchgeführt. DHB: Dihydroxy-Benzoessäure

Wie angegeben, erfolgte die Zuordnung der Signale aus den erhaltenen Massenspektren zu den Substratfragmenten zum einen über die eindeutige Fragmentidentifizierung mittels Tandem-MS bzw. zum anderen mit Hilfe der computergestützten Datenbank GPMW32. Diese nimmt Zuordnungen der Massensignale zu Substratfragmenten anhand des Masse/Ladung-Verhältnisses innerhalb eines bestimmten Fehlerbereiches und ohne Spezifikation der Spaltstellen vor. Auf Grundlage dieser Datenbank und unter Berücksichtigung der durch Tandem-MS identifizierten Spaltstellen sowie Spalthäufigkeiten wurden die Massenspektren ausgewertet und Schnittkarten erstellt.

2.2.4.11 Analyse des Substrateinflusses auf die peptidspaltende Aktivität des 26S Proteasoms

26S Puffer: 50mM Tris-Cl, pH=7,2, 5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,5mM DTT; 2,5% Glycerol, 2mM ATP, 5mM Kreatinphosphat, 0,6U/mL Kreatinkinase

20S Puffer: TEAD-Puffer (20mM Tris-Cl, pH=7,2, 1mM EDTA, 1mM NaN₃, 1mM DTT)

Peptide: MUC₃ (Kloe105) und MUC₉₅₀₋₉₅₈ (Kloe241) wurden von Peter Henklein, Institut für Biochemie, CCM, Berlin synthetisiert und in 5% DMSO in einer Stock-Konzentration von 1mM gelöst.

Die Analyse des Einflusses von Modellsubstraten auf die peptidspaltende Aktivität des 26S Proteasoms erfolgte durch eine Kombination der Versuche „*In vitro* Degradation von Modellsubstraten“, Kapitel 2.2.4.9 und „Aktivitätstest mittels fluorogener Peptide“, Kapitel 2.2.4.8. Degradationsansätze mit einem Volumen von 100µL in 26S bzw. 20S Puffer wurden für 15min oder wie angegeben bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden auf 37°C vorgewärmte 100µL 26S bzw. 20S Puffer mit dem jeweiligen fluorogenen Substrat (200µM) zugesetzt, so dass eine finale Konzentration an fluorogenem Peptid von 100µM erhalten wurde. Für die Inhibitorstudien erfolgte eine Vorinkubation des Proteasoms mit dem entsprechenden Hemmstoff für 15min bei 37°C. Die Ermittlung des Einflusses von synthetischen Peptiden auf die proteasomale Aktivität wurde analog vorgenommen, allerdings wurde hier zusätzlich zu der Peptidkonzentration von 300nM (molares Verhältnis Proteasom: Substrat =1:10) die für *in vitro* Verdaus von Peptidsubstraten üblichere Peptidkonzentrationen von 3µM (Proteasom: Substrat =1:100) verwendet.

2.2.4.12 Interaktionsstudien mittels Glycerolgradienten-Zentrifugation

TSD-Puffer (frisch ansetzen): 10mM Tris-Cl, 25mM KCl, 10mM NaCl, 1,1mM MgCl₂, 0,1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM NaN₃, 2mM ATP, pH=7

Es wurde in einem Polyallomer-Röhrchen für die Ultrazentrifugation ein Glycerolgradient aus 6,5mL 15% Glycerol und 6,5mL 45% Glycerol in TSD-Puffer hergestellt und mit den Ansätzen überschichtet. Es wurden 150µL Ansätze mit 26S Proteasomen und Ub₅G76-E7 bzw. Ub₅-Muc₄ analysiert, die wie die Degradationsansätze in Kapitel 2.2.4.9 zusammengesetzt waren und für 15min bei 37°C inkubiert wurden. Die Zentrifugation (UZ, Beckman SW40) erfolgte für 16h bei 40000rpm. Die durch Fraktionierung (à 0,5mL) gewonnenen Proben wurden einer Ethanol-fällung unterzogen und mittels Western Blots auf Anwesenheit der 20S und 26S Untereinheit β1, der 19S und 26S Untereinheit Rpn2 und der Präsenz des jeweiligen Substrates getestet.

2.2.4.13 Elektronenmikroskopische Analyse

Die Proteasomanalyse mittels Elektronenmikroskopie wurde von M. Blau (Institut für Biochemie, CCM, Berlin) an einem FEI FP5005 Morgagni Transmissions-Elektronenmikroskop durchgeführt. Für die Negativ-Kontrastierung von Partikeln (*negative stain*) wurden Netze von Quantifoil als Probenträger eingesetzt, die mit einem dünnen Kohlefilm überschichtet wurden. Es wurden 4µL einer verdünnten Lösung isolierten 26S Proteasoms auf das Trägernetz aufgetragen, gewaschen und mit 1%iger Uranylacetatlösung versetzt, die nach 1min Inkubation mit Filterpapier abgezogen wurde. Die Aufnahmen erfolgten bei 80keV und einer 40000fachen Vergrößerung.

2.2.5 Zellkultur

PBS: 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,48g Na₂HPO₄, 0,24 K₂HPO₄, ad 1L dH₂O, pH=7,5

DMEM-Medium komplett: DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 100U/mL Penicillin und Streptomycin, 2mM L-Glutamin

Einfriermedium: DMEM mit 30% FCS, 10% DMSO

Ca²⁺/Mg²⁺-freies Medium: 140mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM NaH₂PO₄•12H₂O, 1,5mM KH₂PO₄, 80μM EDTA, 0,5% Phenolrot, sterilfiltriert

2.2.5.1 Kultivierung von COS-7-Zellen

COS-7-Zellen (SV40 transformierte Nierenzellen aus einem Affen der Spezies *Cercopithecus aethiops*) wurden in komplettem DMEM-Medium im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Wasserdampf kultiviert. Vor dem Ernten wurden die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit Trypsin/EDTA 1:4 in PBS verdünnt. Die Passagierung wurde durch Verdünnung der Zellsuspension 1:4 bzw. 1:8 erreicht, indem ein Anteil der Suspension in eine neue mit Medium bestückte Kulturschale überführt wurde.

2.2.5.2 Einfrieren und Auftauen von COS-7-Zellen

1x10⁶ Zellen wurden geerntet, pelletiert, in 1ml kaltem Einfriermedium aufgenommen, in Kryo-Einfrier Röhrchen überführt und in einer eisgekühlten Isopropanol-Einfrierbox bei -70°C eingefroren. Diese ermöglicht eine kontinuierliche Temperaturabnahme von 1°C/min. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -196°C.

Das Auftauen der Zellen wurde im Wasserbad bei 37°C ausgeführt. Die Zellen wurden in komplettes DMEM-Medium überführt, pelletiert und in frischem kompletten DMEM aufgenommen und kultiviert.

2.2.5.3 Zelltransfektion mittels FuGENE6

Auf 6-*well*-Platten kultivierte COS-7-Zellen wurden bei 75%iger Konfluenz für Transfektionsexperimente eingesetzt. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und jedes *well* mit 2mL serum- und antibiotikumfreien DMEM beschichtet. Parallel wurden 3μL FuGENE-Transfektionsreagenz für 5min in 100μL DMEM inkubiert und 1μg der zur transfizierenden DNA (pcDNA-His-UbV76-E7, pcDNA-His-UbG76-E7 bzw. zur Kontrolle pEGFP-N3) zugegeben. Die folgende Inkubation von 20min bei RT führte zur Ausbildung von DNA-Liposom-Komplexen, die zu den DMEM-beschichteten Zellen transferiert wurden. 8h nach Transfektion wurde das Medium durch DMEM-komplett ausgetauscht. 24h nach Transfektion erfolgte die Überprüfung der Transfektionseffizienz, die generell etwa 60-70% betrug, indem die mit pEGFP-N3 transfizierten Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden. Jeweils ein Teil der pcDNA-transfizierten Zellen wurde 24h nach Transfektion für 8h mit 50μM MG132 bzw. Mock-behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mittels Ca²⁺/Mg²⁺-freiem Medium abgelöst, in PBS pelletiert und der Zelllyse zugeführt.

2.2.5.4 Zelllyse

RIPA-Puffer: 50mM Tris-Cl, pH=8, 150mM NaCl, 1% NP40, 0,5% Na-DOC, 0,1% SDS

Die aus dem jeweiligen 6-*well* erhaltenen Zellpellets wurden in 150μL eiskaltem RIPA-Puffer mit Complete-Inhibitor-Mix resuspendiert und für 20min auf Eis inkubiert. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 14000rpm wurde die Proteinkonzentration des Überstandes spektralphotometrisch bestimmt. 50μg des Überstandes sowie die Zellpellets wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 5min bei 95°C erhitzt und bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung und folgender Analyse mittels Western Blots bei -20°C gelagert.

3 ERGEBNISSE

3.1 DAS UFD-BASIERTE *IN VITRO* DEGRADATIONSSYSTEM ZUR ANALYSE DES 26S PROTEASOMS

Die Arbeitsgruppe um C. Pickart veröffentlichte im Jahr 2000 eine Methode, die die rekombinante Generierung eines penta-ubiquitinierten und ^{35}S -markierten Substrates in kleinem Maßstab ermöglichte (Thrower *et al.*, 2000). Das auf diese Weise gewonnene Protein Ub₅V76-DHFR (Penta-Ubiquitin-Dihydrofolat-Reduktase) wurde *in vitro* von aus Erythrozyten isoliertem 26S Proteasom prozessiert. Dies Resultat zeigte, dass sich der Ubiquitin-Fusions-Degradations-Weg (UFD) als Grundlage für ein funktionelles *in vitro* Abbausystem eignet (Bachmair *et al.*, 1986; Johnson *et al.*, 1995). Daneben konnte in der Studie von Thrower *et al.* Tetra-Ubiquitin (Ub₄) als das minimale und universale Signal für die proteasomale Substraterkennung identifiziert werden. Der Umsatz von Ub₅V76-DHFR erfolgte allerdings 50-mal langsamer als der von Peptiden, was die Autoren zu der Hypothese veranlasste, dass die Denaturierung des Substrates, insbesondere des nach Deubiquitinierung noch im UbV76-DHFR Fusionsprotein vorliegenden Ubiquitins (Ub), die Abbaugeschwindigkeit bestimmt.

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war, die o.g. Methode auf die *in vitro* Generierung, Ubiquitinierung und Degradation von viralen bzw. Tumorantigenen anzuwenden und dahingehend zu optimieren, dass eine massenspektrometrische Analyse der Degradationsprodukte möglich wird. Dies sollte zum einen durch eine Weiterentwicklung der *in vitro* Generierung in Richtung eines größeren Maßstabes erreicht werden, um Substrate in Milligramm-Mengen zu erhalten. Zum anderen war geplant, die Reaktionsbedingungen für die *in vitro* Degradation hinsichtlich einer verbesserten Abbaurrate bzw. Abbaugeschwindigkeit zu verändern.

3.1.1 *In vitro* Generierung von Tetra-Ubiquitin und Ub₅V76-E7

Als Substrat wurde das HPV16 E7-Protein (Humanes Papillomvirus Typ16 E7-Protein) ausgewählt, das wegen seiner essentiellen Funktion bei der Etablierung einer HPV-Infektion und seiner zelltransformierenden und immortalisierenden Fähigkeit von besonderer medizinischer Bedeutung ist (Munger & Howley, 2002). HPV16 E7 wird proteasom- und ubiquitinabhängig abgebaut, wobei E7-Epitope entstehen, die u.a. HLA-A*0201 restringiert auf der Zelloberfläche HPV-infizierter Zellen präsentiert werden (Reinstein *et al.*, 2000; Rensing *et al.*, 1995). In Analogie zu der von Thrower *et al.* publizierten rekombinanten Generierung von Ub₅V76-DHFR galt es, das Protein Ub₅V76-E7 zu gewinnen, indem Ub₄ mittels des E2-Enzyms E2-25K an ein UbV76-E7 Fusionsprotein konjugiert wird. Die Verwendung der Mutante UbV76 in dem Fusionsprotein an Stelle des Wildtyps UbG76 sollte – wie bei Thrower *et al.* – eine vorzeitige Deubiquitinierung durch Hydrolasen im *in vitro* Degradationsexperiment verhindern (Johnson *et al.*, 1995; Thrower *et al.*, 2000).

Die Abb. 9 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der Generierung von Ub₅V76-E7. In *E. coli* BL21(DE3)pLys wurde zunächst ein His-markiertes UbV76-E7 Fusionsprotein exprimiert und nach Zelllyse mittels Ni²⁺-NTA-Chromatographie und Gelfiltration isoliert (Abb. 9-I).

I. Generierung eines rekombinanten UbV76 – E7 Fusionsproteins

II. Generierung von Tetra-Ubiquitin (A-B) und Ub₅V76-E7 (C):

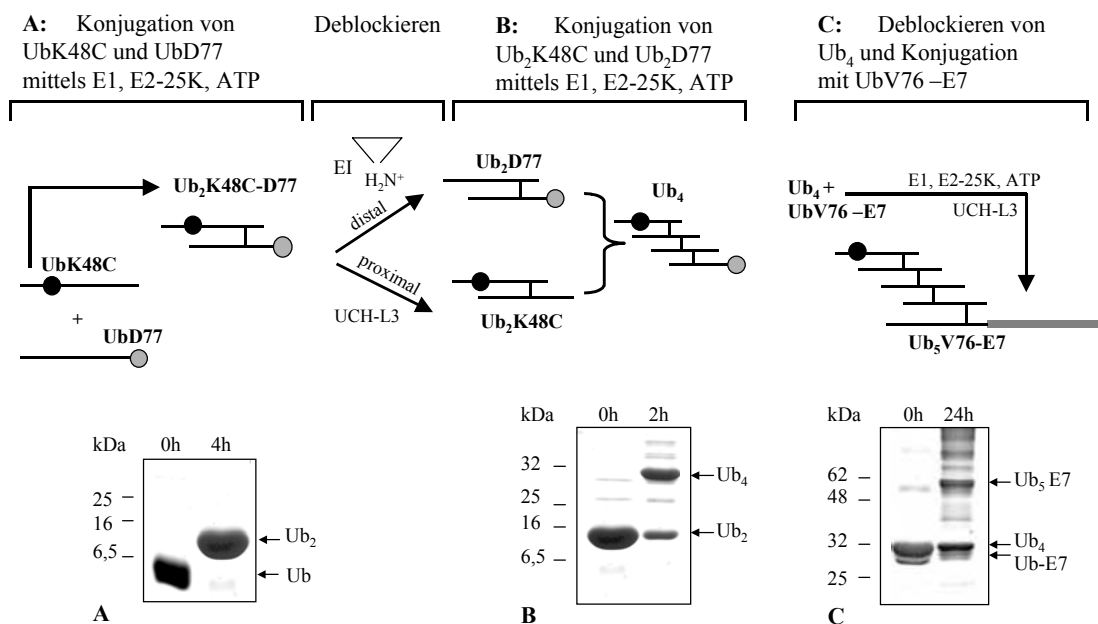


Abb. 9: In vitro Generierung von Tetra-Ubiquitin (Ub₄) und Ub₅V76-E7. (I) Im ersten Schritt wurde ein UbV76-E7 Fusionsprotein rekombinant hergestellt. (II) Der zweite Schritt umfasste die *in vitro* Generierung von Ub₄ (Ub₄K48C-D77) und von dem finalen Substrat Ub₅V76-E7. (A) Zur Gewinnung von Ub₄ wurde zunächst Ub₂ hergestellt, indem die unterschiedlich blockierten Ub-Mutanten UbK48C und UbD77 mittels einer Konjugation verknüpft wurden. (B) Darauf folgten Deblockierungsschritte und eine zweite Konjugationsreaktion, aus der Ub₄ hervorging. (C) Ub₅V76-E7 wurde durch Konjugation von deblockiertem Ub₄ mit UbV76-E7 erhalten. Für die Western Blots wurde ein Ub-spezifischer Antikörper verwendet. E1: Ub-aktivierendes E1-Enzym, E2-25K: Ub-konjugierendes E2-Enzym, EI: Ethylenimin, UCH-L3: Ub COOH-terminal hydrolase L3

Zur Herstellung von Ub₄ wurden im ersten Schritt die Ub-Mutanten UbK48C und UbD77 ebenfalls rekombinant gewonnen und aufgereinigt (Abb. 9-II). Die Mutationen führten dazu, dass eine Verknüpfung der beiden Proteine mit Hilfe des spezifischen E2-Enzyms E2-25K ausschließlich über die nicht blockierten Aminosäuren K48 der Mutante UbD77 und G76 der Mutante UbK48C stattfand. Für die folgende Konjugation der beiden Ub-Mutanten wurde für eine effiziente Reaktion wesentlich mehr E2-25K (20µM) benötigt, als für ein Enzym – wie z.B. das eingesetzte E1 (0,1µM) – typisch ist. Wegen des relativ großen Bedarfs an E2-25K wurde dieses Protein ebenfalls rekombinant in *E. coli* BL21(DE3)pLys exprimiert, chromatographisch isoliert und auf Aktivität getestet. Ausgehend von 60mg pro Ub-Mutante konnten nach fast vollständiger Konjugation (Abb. 9A) und den folgenden Anionen- und Kationenaustauscher-Chromatographien etwa 40mg Ub₂ (Ub₂K48C-D77) gewonnen werden. Ein Teil des erhaltenen Ub₂ wurde distal, der andere proximal deblockiert und beide Teile zur

Gewinnung von Ub₄ (Ub₄K48C-D77) im zweiten Konjugationsschritt eingesetzt (Abb. 9B). Nach anschließenden Anionen- und Kationenaustauscher-Chromatographien lagen 30mg Ub₄ vor, von denen 5mg für die finale Konjugation an das Fusionsprotein UbV76-E7 (0,5mg) verwendet wurden. Aus dieser Reaktion und den folgenden Reinigungsschritten (Ni²⁺-NTA-Chromatographie und Gelfiltration) sind 0,75mg Ub₅V76-E7 hervorgegangen (Abb. 9C).

3.1.2 Struktur- und Funktionsanalyse der isolierten 26S und 20S Proteasomen

Für die folgenden *in vitro* Prozessierungsexperimente wurden 26S und 20S Proteasomen aus Erythrozyten isoliert (Dahlmann *et al.*, 1995; Groettrup *et al.*, 1995; Hough *et al.*, 1987). Die Präparation der 26S-Komplexe erfolgte in Anlehnung an die Methode von Dahlmann *et al.* und wurde dahingehend verändert, dass eine größtmögliche Abtrennung der Peptidase TPPII möglich war. Die Proteasomen wurden anschließend hinsichtlich ihrer Struktur und ihrer peptidspaltenden Eigenschaften analysiert.

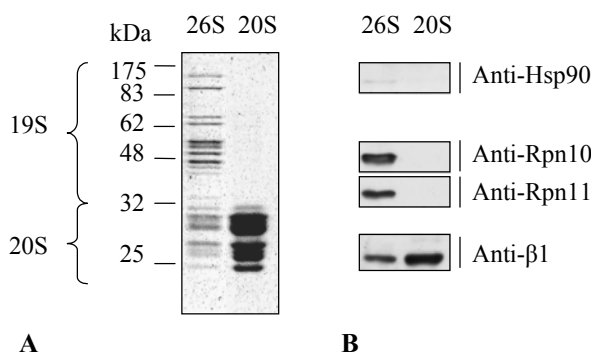


Abb. 10: Strukturelle Analyse von isolierten 26S und 20S Proteasomen. (A) 12,5µg 26S und 20S Proteasom wurden einer SDS-PAGE unterzogen. Die folgende Coomassie-Färbung zeigt die Reinheit der Präparationen. (B) Ein parallel durchgeführter Western Blot mit den angegebenen Antikörpern demonstriert die Anwesenheit der 19S Untereinheiten Rpn10 und Rpn11 und damit die Integrität des isolierten 26S Proteasoms.

Aus Abb. 10A ist der hohe Reinheitsgrad der Präparationen ersichtlich. Abb. 10B zeigt, dass die 26S-Komplexe die für die Bindung ubiquitinerter Substrate notwendige Untereinheit Rpn10 enthalten, wie auch die für die Deubiquitinierung mitverantwortliche Untereinheit Rpn11 (Deveraux *et al.*, 1994; Verma *et al.*, 2002; Yao & Cohen, 2002). Das Chaperon Hsp90, welches während einer Isolierung von 20S Proteasomen schwer abzureichern ist, war in der finalen 20S Präparation nicht zu detektieren.

Die Präparationen wurden einer Nativ-PAGE mit anschließendem fluorogenen Peptid-overlay unterzogen (Abb. 11A). Alle Banden, die eine peptidspaltende Aktivität aufwiesen, ließen sich den erwarteten Proteasomkomplexen zuordnen. Dabei enthielt die 26S Präparation zu etwa gleichen Teilen Komplexe mit einem 19S Regulator (RP₁CP) bzw. zwei 19S Regulatoren (RP₂CP). Daneben befand sich in dieser Präparation auch ein geringer Anteil reinen 20S Proteasoms (CP: *core*-Partikel). Die elektronenmikroskopische Aufnahme zu den isolierten 26S Proteasomen (Abb. 11B) zeigte für die Komplexe die von Yoshimura *et al.* veröffentlichte Proteasomstruktur (Yoshimura *et al.*, 1993). Die

20S und 26S Präparationen entsprachen also in ihrer Struktur und peptidspaltenden Fähigkeit den Referenzpräparationen (Dahlmann *et al.*, 1995; Hough *et al.*, 1987).

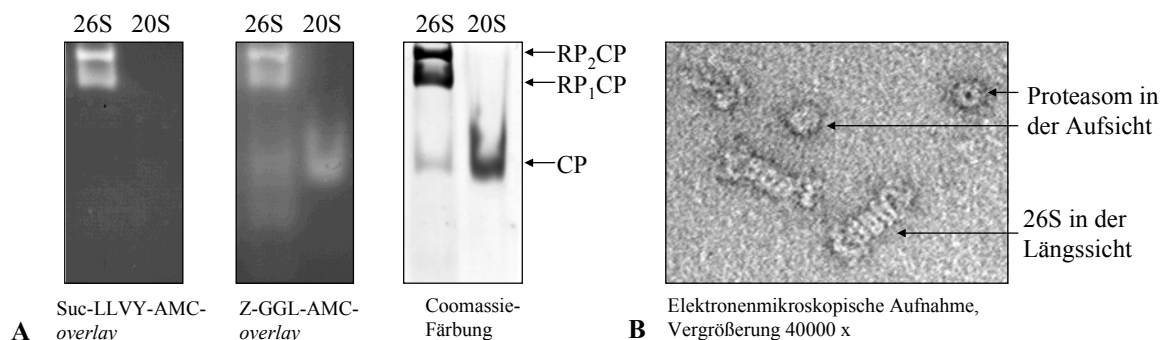


Abb. 11: Überprüfung der Integrität der Proteasomkomplexe mittels Nativ-PAGE und Elektronenmikroskopie. (A) Eine Nativ-PAGE (4%) von jeweils 12,5µg der isolierten 26S bzw. 20S Proteasomen zeigt die für Proteasomen typische Komplexverteilung sowie die entsprechenden peptidspaltenden Aktivitäten. (B) Die Integrität des 26S Proteasoms wurde zudem mittels Elektronenmikroskopie (*negative stain*) bestätigt. RP₂CP: 26S mit 2x19S, RP₁CP: 26S mit 1x19S, CP: 20S *core*-Partikel

3.1.3 Das Substrat Ub₅V76-E7 und dessen proteasomale Prozessierung *in vitro*

In Abb. 12A ist der schematische Aufbau des Substrates Ub₅V76-E7 dargestellt, dessen Besonderheit in der Verwendung des mutierten UbV76 an Stelle eines Wildtyp-Ub im Ub-E7 Fusionsprotein liegt. Diese Mutation sollte einer vorzeitigen Deubiquitinierung des Substrates und damit einem Verlust der Ub-Markierung im *in vitro* Degradationsansatz entgegenwirken (Johnson *et al.*, 1995; Thrower *et al.*, 2000). Die Reinheit des *in vitro* generierten Substrates ist der Abb. 12B zu entnehmen.

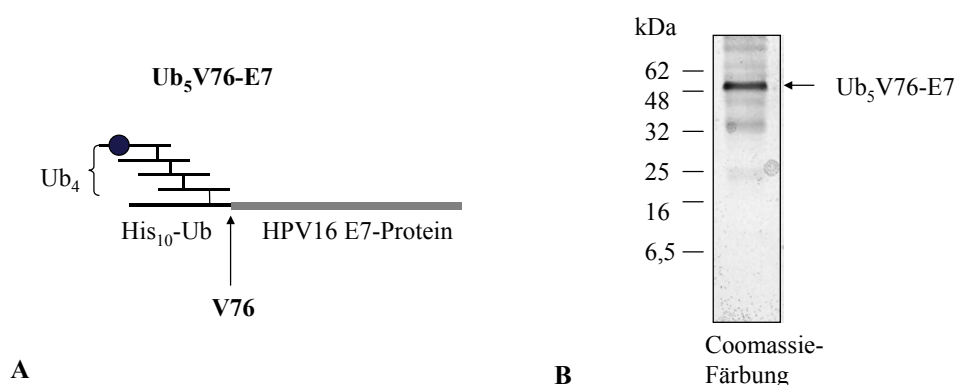


Abb. 12: Darstellung von Ub₅V76-E7 schematisch und nach rekombinanter Generierung mittels SDS-PAGE. (A) Ub₅V76-E7 entstand durch Konjugation von Ub₄ mit dem Fusionsprotein UbV76-E7, welches über eine NH₂-terminale His₁₀-Markierung verfügt und eine G76V-Mutation im Ub-Anteil besitzt. (B) Die Reinheit des 52kDa großen Proteins Ub₅V76-E7 zeigte sich nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.

Das in Abb. 13A aufgeführte *in vitro* Prozessierungsexperiment, in dem 30nM Proteasom und 300nM Substrat in einem Tris-gepufferten sowie ATP-regenerierenden System eingesetzt wurden, zeigt über einen Zeitraum von 24h keine Substratabnahme. Auch eine Änderung des molaren Verhältnisses Proteasom zu Substrat führte nicht zu einem Substratumsatz. In einem Ansatz mit dem CSN-Komplex (COP9-Signalosom) sollte geprüft werden, ob möglicherweise CSN-assoziierte Proteine, welche dem Komplex u.a. deubiquitinierende Eigenschaften verleihen, die proteasomale Prozessierung des Substrates ermöglichen (Wei & Deng, 2003). Die Zugabe des COP9-Signalosoms bewirkte zwar die Bildung deubiquitinerter Stufen des Substrates (Abb. 13B). Diese Stufen waren aber stabil und nicht weiter durch das 26S Proteasom abbaubar. Ub₅V76-E7 stellt damit ein Substrat für CSN-assoziierte Deubiquitinasen (DUBs), nicht jedoch für das isolierte Proteasom dar. Dabei ist erwartungsgemäß weder der CSN-Komplex (Abb. 13B), noch das 26S Proteasom in der Lage (Abb. 13C), die stabile UbV76-E7 Fusion zu spalten.

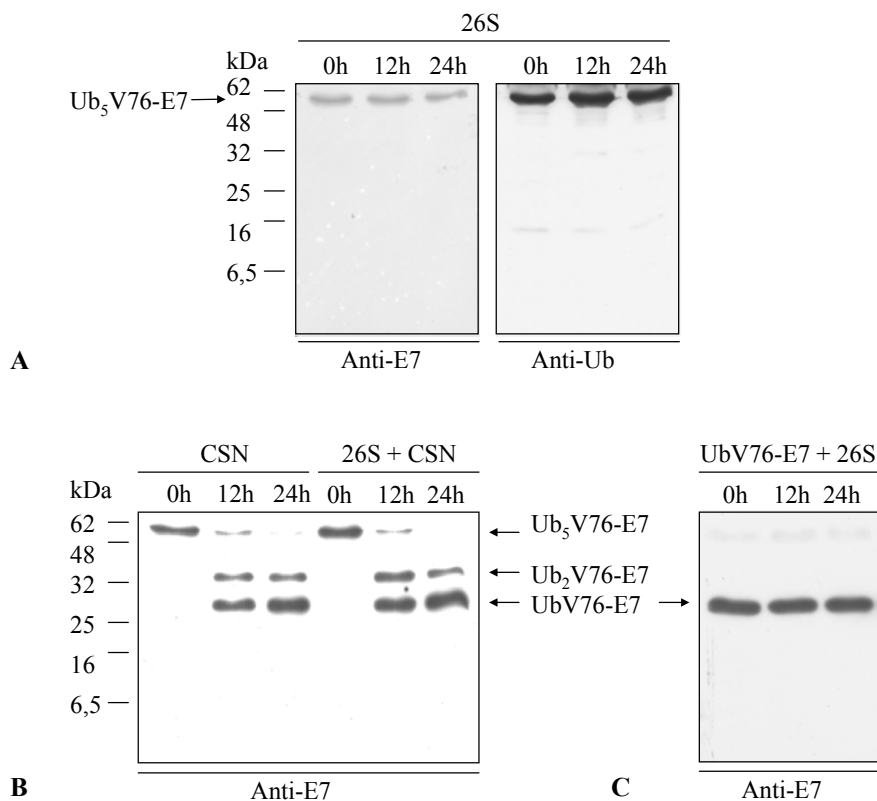


Abb. 13: *In vitro* Abbau von Ub₅V76-E7 durch das 26S Proteasom bzw. den CSN-Komplex. Das Substrat Ub₅V76-E7 (300nM) wurde bei 37°C und für 24h in einem Tris-gepufferten und ATP-regenerierenden System mit **(A)** 26S Proteasomen (30nM) und **(B)** mit isoliertem CSN-Komplex (60nM) bzw. CSN- und 26S-Komplexen inkubiert. **(C)** Analog wurde die Prozessierung des Fusionsprotein UbV76-E7 (300nM) durch das 26S Proteasom untersucht. Die zu den Zeitpunkten 0h, 12h, 24h entnommenen Proben (20µL) wurden mittels Western Blots und den angegebenen Antikörpern analysiert.

Eine Möglichkeit, das Substrat für den proteasomalen Abbau zugänglicher zu machen, wurde darin gesehen, die künstliche Substratstabilisierung mittels des mutierten UbV76 im UbV76-E7 Fusionsprotein aufzuheben. Es schien plausibel, dass die Spaltung der Ub-Protein-Fusion für die proteasomale Substratprozessierung sogar notwendig ist. Denn die Stabilisierung dieser Bindung

erfordert die Entfaltung und Degradation des fusionierten stabilen Ubiquitins, was den Substratumsatz aufhalten könnte. Unterstützt von den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um R. Cohen, die einen schnelleren proteasomalen Abbau des Proteins Ub₅G76-DHFR gegenüber dem von Ub₅V76-DHFR zeigen konnte, wurde im Folgenden zunächst im Zellmodell getestet, ob ein His-markiertes UbG76-E7 Fusionsprotein mit einem Wildtyp-Ub besser proteasomal prozessiert wird als sein UbV76-enthaltendes Pendant (Yao & Cohen, 2002).

3.1.4 Prozessierung der Fusionsproteine UbV76-E7 und UbG76-E7 im Zellmodell

Zur vergleichenden Analyse der proteasomalen Prozessierbarkeit der Substrate UbV76-E7 und UbG76-E7 wurden COS-7-Zellen mit pcDNA-Konstrukten transfiziert, die eine transiente Synthese der genannten Fusionsproteine ermöglichten. 24h nach Transfektion wurden die Zellen für 8h ohne bzw. mit 50µM MG132 inkubiert, um die Substratprozessierung durch das Proteasom spezifisch zu hemmen. Damit sollte der proteasomale Anteil am Substratumsatz nachgewiesen werden.

Nach Zelllyse in RIPA Puffer und anschließender Zentrifugation wurden die Überstände mit den löslichen Bestandteilen und die in SDS-Probenpuffer resuspendierten Zell-Pellets einer SDS-PAGE und folgendem Western Blot mit einem Anti-E7 Antikörper unterzogen. Abb. 14 veranschaulicht, dass das Protein UbV76-E7 (kurz: V) unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von MG132 stabil und nicht poly-ubiquitiniert vorlag und sowohl in der löslichen (Abb. 14A) als auch in der unlöslichen Fraktion (Abb. 14B) nachweisbar war. Offensichtlich führte die Mutation dazu, dass nicht nur eine Erkennung und Spaltung durch DUBs unterblieb, sondern auch die Erkennung und Modifikation durch (poly-) Ub-übertragende Enzyme (Ub-Ligasen E3 und E4) nicht erfolgte.

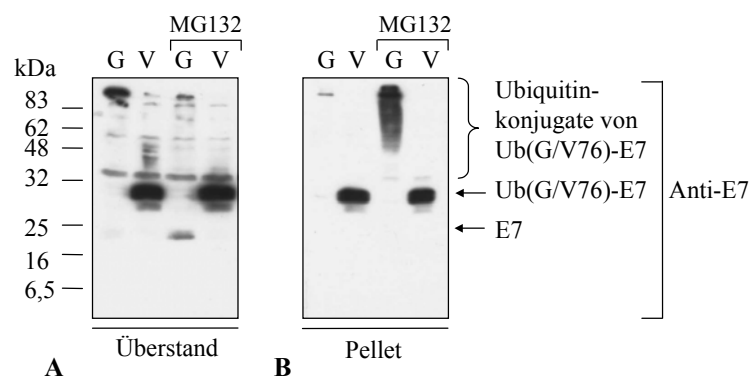


Abb. 14: Analyse der Stabilität der Fusionsproteine UbG76-E7 und UbV76-E7 im Zellmodell. COS-7-Zellen wurden mit pcDNA-Plasmiden transfiziert, die für die Fusionsproteine UbG76-E7 (kurz: G) bzw. UbV76-E7 (kurz: V) kodieren. 24h nach Transfektionen wurde ein Teil der Zellen für 8h mit 50µM MG132 bzw. Mock-behandelt. (A) Überstand und (B) Pellet der Zellysate wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels Western Blots und einem Anti-E7-Antikörper analysiert.

Demgegenüber war das Fusionsprotein UbG76-E7 (kurz: G) in keinem der Ansätze stabilisiert. Erwartungsgemäß bewirkte die Behandlung mit MG132 eine Akkumulation von nicht löslichen Ubiquitinkonjugaten, die das E7-Protein enthalten (Abb. 14B). In der entsprechenden löslichen Fraktion (Abb. 14A, Spur G, MG132) war das E7-Protein detektierbar, welches vermutlich durch

Deubiquitinierung des Fusionsproteins entstanden ist und wegen der Inhibition des Proteasoms durch MG132 stabilisiert wurde.

Das Experiment macht deutlich, dass das Fusionsprotein UbV76-E7 im Zellmodell stabil vorlag, also weder von deubiquitinierenden, noch von Ub-konjugierenden Enzymen als Substrat erkannt wurde. Demgegenüber konnte für das Substrat UbG76-E7 eine ubiquitin- und proteasomabhängige Degradation nachgewiesen werden. Die Mutation V76 im Ub-Anteil des Fusionsproteins führte möglicherweise zu einer Maskierung, die letztlich den proteasomalen Abbau verhinderte. Im nächsten Schritt sollte daher das Protein Ub₅G76-E7 *in vitro* generiert werden in der Annahme, dass es sich besser als proteasomales Modellsubstrat eignet als Ub₅V76-E7.

3.1.5 Das Substrat Ub₅G76-E7 und dessen proteasomale Prozessierung *in vitro*

Die rekombinante Herstellung des Substrates Ub₅G76-E7 erfolgte analog zu der von Ub₅V76-E7 (Abb. 15A). Allerdings erwies sich die Gewinnung des Fusionsproteins UbG76-E7 in *E. coli* BL21(DE3) als problematisch, da es bereits in der Bakterienzelle nach dem Ub gespalten wurde. Dies war insofern überraschend, als dass in Bakterien Ub nicht vorkommt und deshalb mit einer Ub-spezifischen Hydrolase nicht gerechnet werden konnte. Mit dem Wechsel von BL21(DE3)pLys zu HMS174(DE3)pLys Expressionszellen und einer Proteinisolierung, die stringent bei 4°C und mit dem Dreifachen der üblichen Konzentration an Protease-Inhibitor-Cocktail durchgeführt wurde, gelang die Gewinnung von UbG76-E7 und schließlich Ub₅G76-E7 (Abb. 15B).

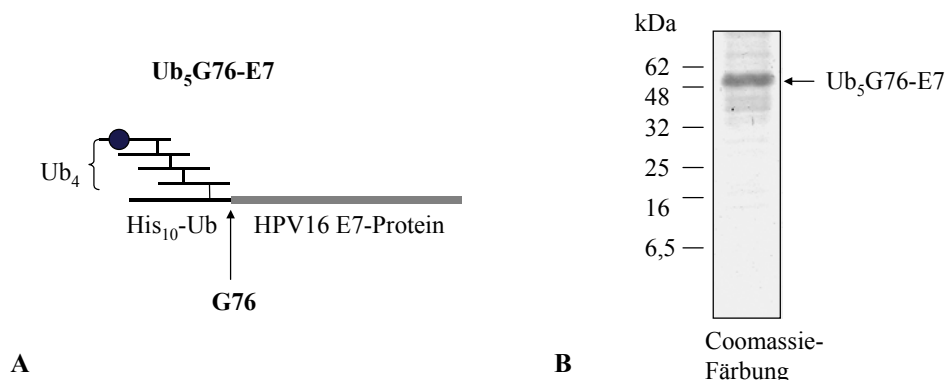


Abb. 15: Darstellung von Ub₅G76-E7 schematisch und nach rekombinanter Generierung mittels SDS-PAGE. (A) Ub₅G76-E7 entstand durch Konjugation von Ub₄ mit dem Fusionsprotein UbG76-E7, welches über eine NH₂-terminale His₁₀-Markierung verfügt und keine Mutation im Ub-Anteil (G76) besitzt. **(B)** Die Reinheit des 52kDa großen Ub₅G76-E7 zeigte sich nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.

Die *in vitro* Prozessierung von Ub₅G76-E7 durch 26S Proteasomen führte bereits nach 1h Inkubation zur Substratabnahme (Abb. 16A und B) unter der Bildung einer Proteinbande, die allerdings nur im Western Blot mit dem Anti-Ub Antikörper detektiert werden konnte (Abb. 16B). Bei diesem Protein handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Ub₅, welches durch Spaltung der Ub-E7 Fusion innerhalb des Substrates Ub₅G76-E7 freigesetzt wurde. Das dabei entstehende E7 war allerdings im Western Blot nicht nachweisbar. Die Substratabnahme beruhte ausschließlich auf Deubiquitinierung,

denn der spezifische Proteasom-Inhibitor Epoxomicin führte nicht zu einer Substratstabilisierung (Abb. 16A und B). Weiterhin war das Substrat nach Inkubation mit dem 20S Proteasom, welches nicht über assoziierte DUBs verfügt, stabil (Abb. 16C). Eine massenspektrometrische Analyse der Prozessierungsprodukte erbrachte den Nachweis der Generierung des E7-Proteins, nicht jedoch kleinerer Fragmente. Demgegenüber zeigte die Analyse des parallel durchgeführten *in vitro* Abbaus des Substrates Ub₅V76-DHFR, welches freundlicherweise von C. Pickart zur Verfügung gestellt wurde, dass DHFR-Fragmente proteasomal generiert wurden. Die im Abbauxperiment eingesetzten 26S Proteasomen waren also nachweislich funktionell.

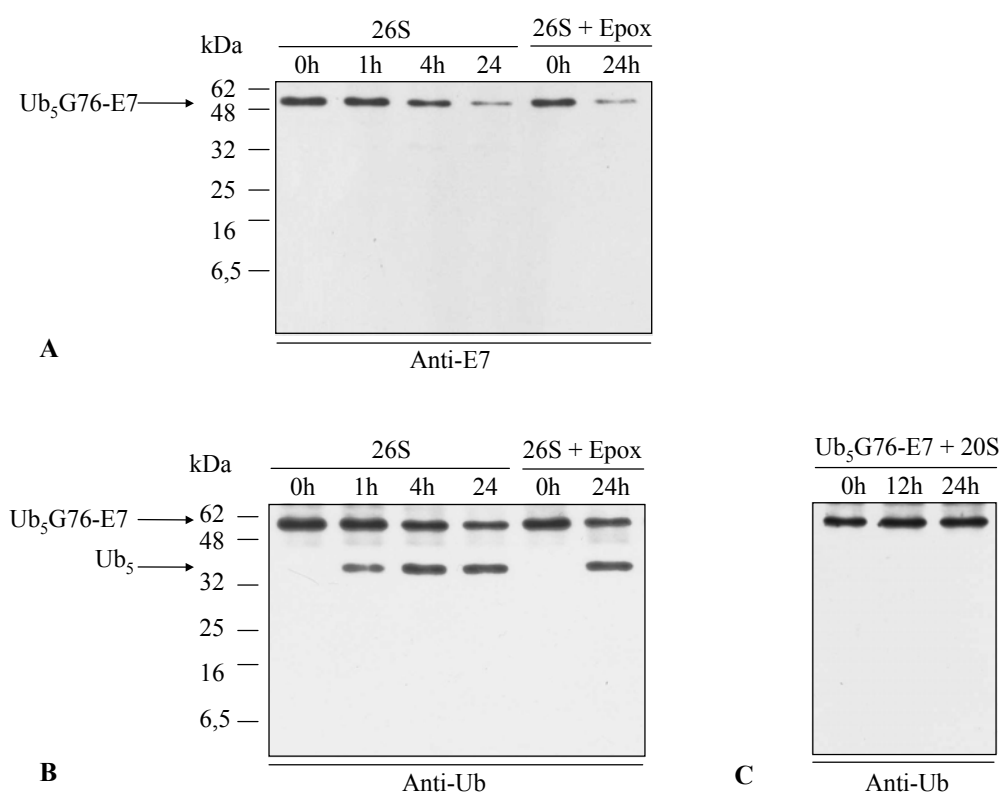


Abb. 16: *In vitro* Prozessierung von Ub₅G76-E7 durch das 26S Proteasom. (A und B) Das Substrat Ub₅G76-E7 (300nM) wurde für 24h bei 37°C mit dem 26S Proteasom (30nM) in einem Tris-gepufferten und ATP-regenerierenden System inkubiert. In den 20µM Epoxomicin-enthaltenden Ansätzen erfolgte eine Vorinkubation des Proteasoms mit dem Inhibitor für 15min bei 37°C. Zu verschiedenen Zeitpunkten entnommene Proben wurden mittels Western Blots mit (A) einem Anti-E7 bzw. (B) einem Anti-Ub Antikörper analysiert. (C) Die Substratinkubation mit dem 20S Proteasom wurde analog durchgeführt. Die Ansätze enthielten allerdings kein ATP. Epox: Epoxomicin

Ein Grund für die nicht erfolgte proteasomale *in vitro* Degradation von Ub₅G76-E7 könnte darin bestehen, dass der Abbau des E7-basierten Substrates zusätzliche Faktoren erfordert. Proteine mit Ub-assoziiierter Domäne (UBA) bzw. Ub-ähnlicher Domäne (UBL) sind in der Lage, bestimmte ubiquitinierte Substrate an den Proteasomkomplex heranzuführen bzw. den Transfer effizienter zu machen (Chen *et al.*, 2001; Funakoshi *et al.*, 2002; Wilkinson *et al.*, 2001). Für andere Hilfsfaktoren wird eine proteasomstabilisierende bzw. eine unterstützende Funktion bei der Substratprozessierung angenommen (Imai *et al.*, 2003). Zum Beispiel ist von dem Chaperon Hsp90 bekannt, dass es den

Abbau von oxidiertem Calmodulin forciert und für die Antigenpräsentation in LPS-stimulierten Lymphozyten (Immunoblasten) aus PA28 $\alpha^{-/-}$ $\beta^{-/-}$ Mäusen essentiell ist (Whittier *et al.*, 2004; Yamano *et al.*, 2002). Der Mechanismus der Interaktion und des Einflusses von Hsp90 auf das Proteasom ist allerdings noch unklar.

Um zu gewährleisten, dass im folgenden *in vitro* Experiment die für die Prozessierung von Ub₅G76-E7 notwendigen Hilfsfaktoren zur Verfügung stehen, wurde an Stelle von isoliertem 26S Proteasom eine Fraktion II Präparation eingesetzt. Fraktion II wurde in Anlehnung an Hershko *et al.* gewonnen: Nach der Lyse von Erythrozyten wurde der durch Zentrifugation erhaltene Überstand auf DEAE-Säulenmaterial transferiert und der an die Säule gebundene Pool an Proteinen mit einer 0,5M NaCl Lösung eluiert (Hershko *et al.*, 1983). Die nach Ammoniumsulfat-Fraktionierung erhaltene und gegen TSDG dialysierte Probe enthielt neben dem Proteasom alle weiteren Komponenten, die für den Abbau ubiquitinerter Substrate ausreichen (Ciechanover *et al.*, 1980; Hershko *et al.*, 1980). Abb. 17C zeigt das Resultat des *in vitro* Prozessierungsexperimentes mit Ub₅G76-E7 und Fraktion II.

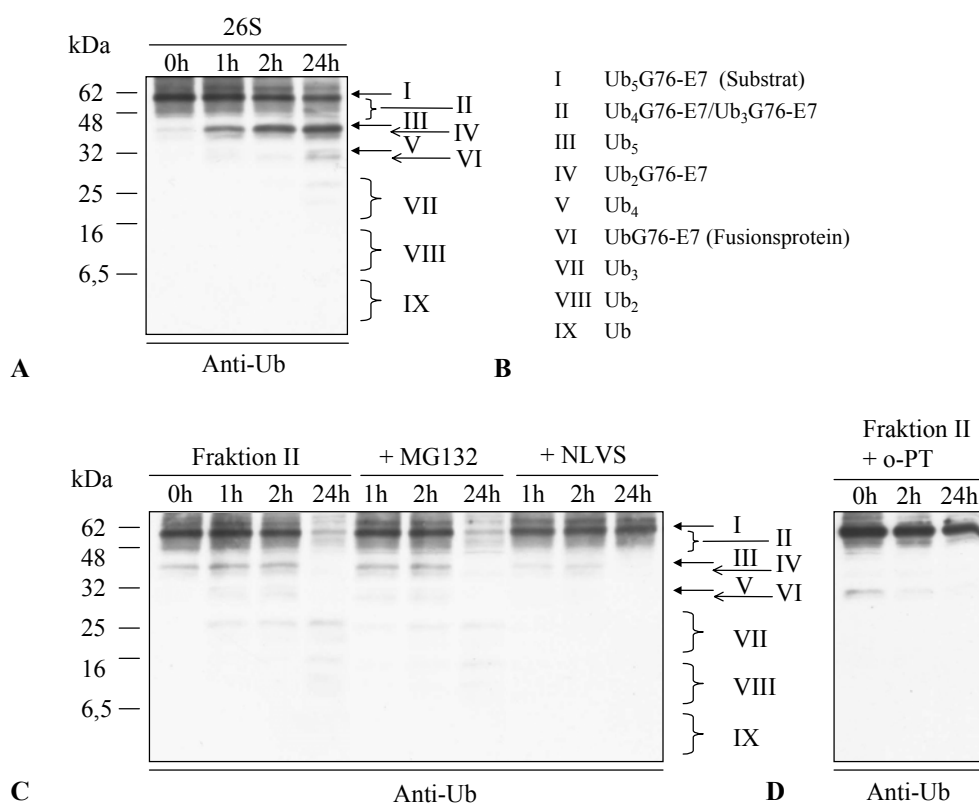


Abb. 17: Hemmung des *in vitro* Umsatzes von Ub₅G76-E7 durch Fraktion II mit Hilfe von DUB-Inhibitoren, aber nicht durch den Proteasom-Inhibitor MG132. (A) Der Kontrollansatz mit 26S Proteasomen entsprach der unter Abb. 16 ausgeführten Reaktion. (B) Die Legende ermöglicht eine Zuordnung der Banden zu den entstandenen Produkten. (C und D) Fraktion II (ca. 30nM 26S-enthaltend) wurde in einem Tris-gepufferten und ATP-regenerierenden System mit den angegebenen Inhibitoren (Mock, 100 μ M MG132, 300 μ M NLVS, 5mM o-PT) für 15min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Substrat Ub₅G76-E7 (300nM) zugegeben. Die zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h, und 24h entnommenen Proben wurden mittels Western Blots und den angegebenen Antikörpern analysiert.

Nach 1h bzw. 2h Inkubation waren deubiquitinierte Spezies nachweisbar wie auch im Vergleichsexperiment mit dem 26S Proteasom (Abb. 17A) an Stelle von Fraktion II. Während aber im Ansatz mit reinem Proteasom die Substratabnahme, die auch nach 24h nicht vollständig war, mit der Zunahme an Ub₅ korrelierte, gingen aus der Reaktion mit Fraktion II weniger Ub₅ und mehr kleinere Ub-Spezies hervor. Daneben war nach 24h kein Substrat mehr detektierbar. Der Umsatz von Ub₅G76-E7 und die Bildung der deubiquitinierten Stufen war zum einen hemmbar mit 300µM NLVS (NIP-Leu-Leu-Leu-Vinylsulfon), einem Inhibitor von Cystein-Proteasen und dem Proteasom und zum anderen mit 5mM o-PT, einem Zn²⁺-Chelator (Abb. 17C und D). Der Proteasom-Inhibitor MG132 (100µM) hatte auf die Substratabnahme keinen Einfluss (Abb. 17C).

Die Inhibitorstudien machen deutlich, dass auch in den Ansätzen mit Fraktion II nicht das Proteasom für die Substratabnahme verantwortlich war, sondern Cystein-Proteasen bzw. Zn²⁺-abhängige Hydrolasen. Dieser Befund spricht für den Substratumsatz durch deubiquitinierende Enzyme, bei denen die zwei großen DUB-Gruppen UCH (*Ub carboxy-terminal hydrolase*) und UBP (*Ub-specific processing protease*) zu den Cystein-Proteasen zählen, während die Gruppe der DUBs mit dem JAMM-Motiv (*Jab-MPN domain metalloenzyme*) Metallo-Hydrolasen vereint. Die massenspektrometrische Analyse der Prozessierungsprodukte bestätigte, dass neben den Ub-Konjugaten nur E7, aber keine E7-Fragmente entstanden sind, also kein proteasomaler Abbau stattgefunden hat. Das E7-Protein ist in Form eines rekombinanten tetra-ubiquitinierten Ub-E7 Fusionsproteins offensichtlich nicht als Modells substrat nutzbar, mit dessen Hilfe die antigenprozessierende Eigenschaft des 26S Proteasoms untersucht werden kann.

3.1.6 Das Substrat Ub₅-MUC₄ und dessen proteasomale Prozessierung *in vitro*

Als proteasomales Substrat besser geeignet sollte dagegen ein Protein sein, welches ein vom Proteasom potentiell generierbares Epitop in mehreren Kopien enthält. Dieses Polyepitop wäre nicht nur einer effizienten Substratprozessierung förderlich, sondern würde wegen einer erreichbaren Signalverstärkung auch die Produktanalyse erleichtern.

G. Hoffmann hatte bereits in ihrer Promotionsarbeit nachgewiesen, dass ein Polyepitop – bestehend aus drei aufeinander folgenden MUC1₉₅₀₋₉₅₈-Epitopen des Glykoproteins Mucin1 – in *in vitro* Degradationsexperimenten mit dem 20S Proteasom prozessiert wird, wobei Einfach- und Doppelepitope entstehen (Hoffmann, 2004). Mucin zählt zu den sogenannten tumorassoziierten Antigenen und war Gegenstand der Untersuchung, um am Beispiel dieses Antigens eine Proteasomen-basierte Polyepitop-Plasmid-Vakzine zu entwickeln. U.a. konnte G. Hoffmann im Zellmodell darstellen, dass ein UbG76-(MUC1₉₅₀₋₉₅₈)₄ Fusionsprotein besser proteasomal prozessiert wird als das UbA76-enthaltende Analogon. Darauf aufbauend war geplant, das Protein Ub₅G76-(MUC1₉₅₀₋₉₅₈)₄, welches im Folgenden als Ub₅-MUC₄ bezeichnet wird, *in vitro* herzustellen und im Prozessierungsexperiment mit isoliertem 26S Proteasom einzusetzen.

Nach der rekombinanten Generierung von Ub-MUC₄ in *E. coli* HMS174(DE3)pLys erfolgte die Konjugation von Ub₄ mittels E2-25K. Das entstandene Produkt Ub₅-MUC₄ wurde mittels einer SDS-PAGE (Abb. 18B) analysiert und ist in Abb. 18A schematisch dargestellt.

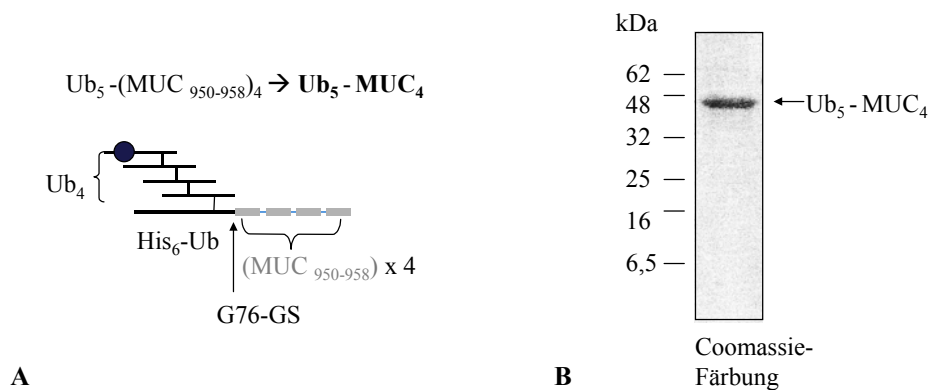


Abb. 18: Darstellung von Ub₅-MUC₄ schematisch und nach rekombinanter Generierung mittels SDS-PAGE. (A) Ub₅-MUC₄ entstand durch Konjugation von Ub₄ mit dem Fusionsprotein Ub-MUC₄, welches über eine NH₂-terminale His₆-Markierung verfügt und zwischen UbG76 und dem Beginn der MUC-Folge eine Insertion der Aminosäuren Glycin und Serin enthält. **(B)** Die Reinheit des 44kDa Ub₅-MUC₄ zeigte sich nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.

Es sei darauf hingewiesen, dass innerhalb des Fusionsproteins zwischen Ub und dem Vierfachepitop die Aminosäuren Glycin und Serin eingeführt wurden, deren entsprechende Codons einer BamHI Schnittstelle entsprechen. Diese sollte die Konstruktion von Plasmid-Vektoren für die Synthese weiterer Fusionsproteine im Verlauf der Arbeit erleichtern und auf Aminosäure-Ebene keinen gravierenden Einfluss auf die Substratprozessierung durch das 26S Proteasom haben. Der Abb. 19A lässt sich das Resultat des *in vitro* Prozessierungsexperimentes mit Ub₅-MUC₄ entnehmen. Das Substrat Ub₅-MUC₄ wurde zum großen Teil bereits innerhalb von zwei Stunden vom 26S Proteasom abgebaut. Nach 24 Stunden war kaum noch Ub₅-MUC₄ detektierbar. Die Inkubation mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 führte zu einer Teilstabilisierung des Substrates und des Produktes Ub-MUC₄ (VII). Dieses Ergebnis weist auf einen proteasomabhängigen Substratumsatz hin. Danach hätte aber insbesondere das Vierfachepitop nach Proteasomhemmung detektierbar sein müssen, dessen Entstehung durch Deubiquitinierung nicht behindert sein sollte. Wegen seiner geringen Länge von 36 Aminosäuren war es allerdings trotz Verwendung eines 17,5%-igen Acrylamid SDS-Geles nicht nachweisbar. Eine höhere Acrylamid-Konzentration hätte das Einlaufen des 44kDa großen Ub₅-MUC₄ in das Gel beeinträchtigt und damit die Analyse des Substratabbaus nicht möglich gemacht. Dass der Einsatz von MG132 auch zur Stabilisierung von Ub-enthaltenden Substratstufen führte, also auch die Deubiquitinierung beeinflusste, ist vermutlich Folge einer sterischen Behinderung. Möglicherweise führte die Hemmung der Proteolyse zu einem Anstau an den proteasomalen Substrat-Bindungsstellen, so dass Bindung und Deubiquitinierung weiterer Substratmoleküle eingeschränkt waren.

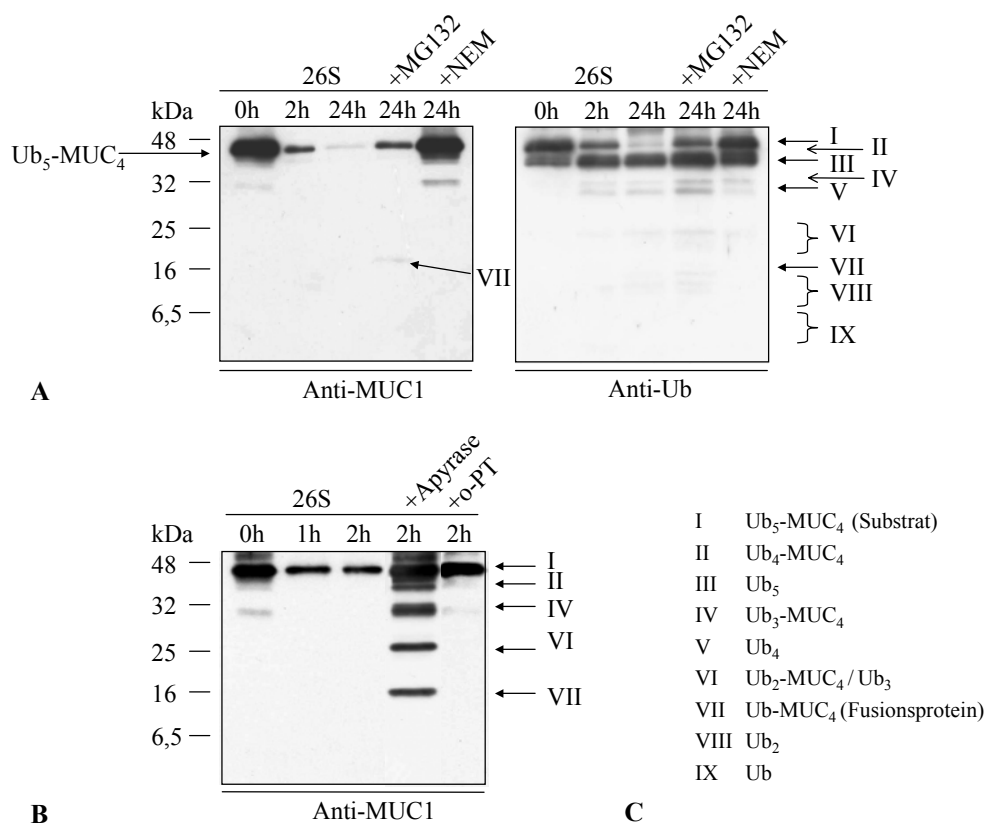


Abb. 19: *In vitro* Degradation von Ub₅-MUC₄ durch das 26S Proteasom und Abbau-Hemmung mit DUB- und Proteasom-Inhibitoren. (A und B) 26S Proteasomen (30nM) wurden mit dem Substrat Ub₅-MUC₄ (300nM) in einem Tris-gepufferten und ATP-regenerierenden System bei 37°C inkubiert. Die zu den angegebenen Zeitpunkten entnommenen Proben wurden mittels Western Blots mit den aufgeführten Antikörpern analysiert. In den Inhibitor-enthaltenden Ansätzen wurden die 26S Proteasomen mit dem jeweiligen Hemmstoff (100µM MG132, 5mM NEM, 25U/mL Apyrase, 5mM o-PT) für 15min bei 37°C vorinkubiert. (C) Die Legende ermöglicht eine Zuordnung der Banden zu den entstandenen Produkten.

Der Inhibitor NEM verursachte eine vollständige Substratstabilisierung (Abb. 19A). Er fungiert als alkylierendes Agens an SH-Gruppen von Cystein-Resten und wird als klassischer Hemmer von DUBs eingesetzt, die über Cysteine wirksam sind. Allerdings hat die Analyse NEM behandelter 26S Proteasomen mittels Nativ-PAGE demonstriert, dass der Inhibitor in der gewöhnlich eingesetzten Konzentration von 5mM zum Zerfall des 26S Proteasoms in seine Subkomplexe führt und daher nicht als DUB-spezifischer Hemmer gelten kann (Kapitel 3.3, Abb. 26).

Um zu prüfen, ob der *in vitro* Umsatz von Ub₅-MUC₄ durch das 26S Proteasom ATP erfordert, wie es für die Degradation eines Proteins durch den 26S-Komplex zu erwarten ist, wurde Apyrase zur ATP-Depletion eingesetzt. In Abb. 19B ist eine deutliche Stabilisierung des Substrates und deubiquitinierte Stufen durch Apyrase erkennbar. Dieses Resultat bestätigt die ATP-Abhängigkeit der 26S proteasomalen Substratdegradation. Sie beruht auf der essentiellen Bedeutung der ATPasen für die Komplexstabilität (Eytan *et al.*, 1989) und für die Prozessierungsschritte Substratbindung über Rpt5, den *gating*-Prozess und die Substrattranslokation bzw. -denaturierung (Kohler *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2002; Ogura & Tanaka, 2003; Rubin *et al.*, 1998). Daneben scheint auch die Deubiquitinierung von

der Wirkung der Apyrase betroffen zu sein. Entweder liegt auch hier eine ATP-Abhängigkeit vor oder – wie im Fall des Ansatzes mit MG132 – eine Behinderung der Substratdeubiquitinierung, da einer der Folgeschritte inhibiert ist.

Die Inkubation mit dem Zn^{2+} -Chelator o-PT konnte die Substratprozessierung nahezu vollständig aufhalten und unterstreicht damit die Bedeutung der Zn^{2+} -abhängigen DUB Rpn11 und die zentrale Rolle der Deubiquitinierung für den proteasomalen Substratumsatz (Abb. 19B) (Verma *et al.*, 2002; Yao & Cohen, 2002).

Abschließend galt es zu bestätigen, dass der Abbau von $\text{Ub}_5\text{-MUC}_4$ die enzymatischen Eigenschaften des 26S Proteasoms erfordert und umgekehrt das 26S Proteasom nur ein Substrat umzusetzen vermag, das – wie $\text{Ub}_5\text{-MUC}_4$ – mit Ub_4 über das minimale Signal für die ubiquitinabhängige proteasomale Substraterkennung verfügt. Dazu wurde zum einen die Prozessierung des nicht tetra-ubiquitinierten Ub-MUC_4 Fusionsproteins durch das 26S Proteasom analysiert und zum anderen untersucht, ob der 20S *core*-Partikel allein zum Umsatz eines penta-ubiquitinierten Substrates in der Lage ist.

Im Vergleich zum Ansatz mit $\text{Ub}_5\text{-MUC}_4$ und 26S Proteasomen (Abb. 20A), bei dem nach 1h etwa 2/3 des Substrates prozessiert waren, betrug die Substratabnahme in der Reaktion mit dem Fusionsprotein und 26S Proteasomen weniger als die Hälfte (Abb. 20B). Dabei entstanden Ub und vermutlich das Viererepitop, welches nach dem Western Blot des 17,5%-igen Acrylamid SDS-Gels nicht detektiert werden konnte. Demnach erfolgte durch das 26S Proteasom eine Deubiquitinierung des Fusionsproteins. Die geringere Effizienz der Ub -Abspaltung ist sehr wahrscheinlich auf die schwächere Affinität des Fusionsproteins zurückzuführen, welches im Gegensatz zu $\text{Ub}_5\text{-MUC}_4$ nur ein Ub -Molekül enthält.

Die Inkubation von $\text{Ub}_5\text{-MUC}_4$ mit dem 20S Proteasom führte selbst nach 8 bzw. 24 Stunden zu keiner Substratabnahme (Abb. 20C). Die Reaktion mit 20S Proteasomen und dem Fusionsprotein zeigte einen marginalen Substratumsatz und Abbauprodukte (Abb. 20D). Es ist anzunehmen, dass im Zuge der 24-stündigen Inkubation bei 37°C ein Teil der Substrate destabilisiert und über den MUC-Anteil vom 20S Proteasom degradiert wurde.

Die Ergebnisse lassen folgendes Resümee zu: Das rekombinant gewonnene Protein $\text{Ub}_5\text{-MUC}_4$ ist als Modells substrat für das 26S Proteasom geeignet. Es wird in Abhängigkeit

- von der Bindung des Ub_5 -Anteils des Substrates an das 26S Proteasom,
- von der anschließenden Deubiquitinierung und
- von ATP

durch das 26S Proteasom prozessiert. Eine genauere Analyse der Prozessierung sollte durch die Identifizierung der Degradationsprodukte mittels Massenspektrometrie erfolgen.

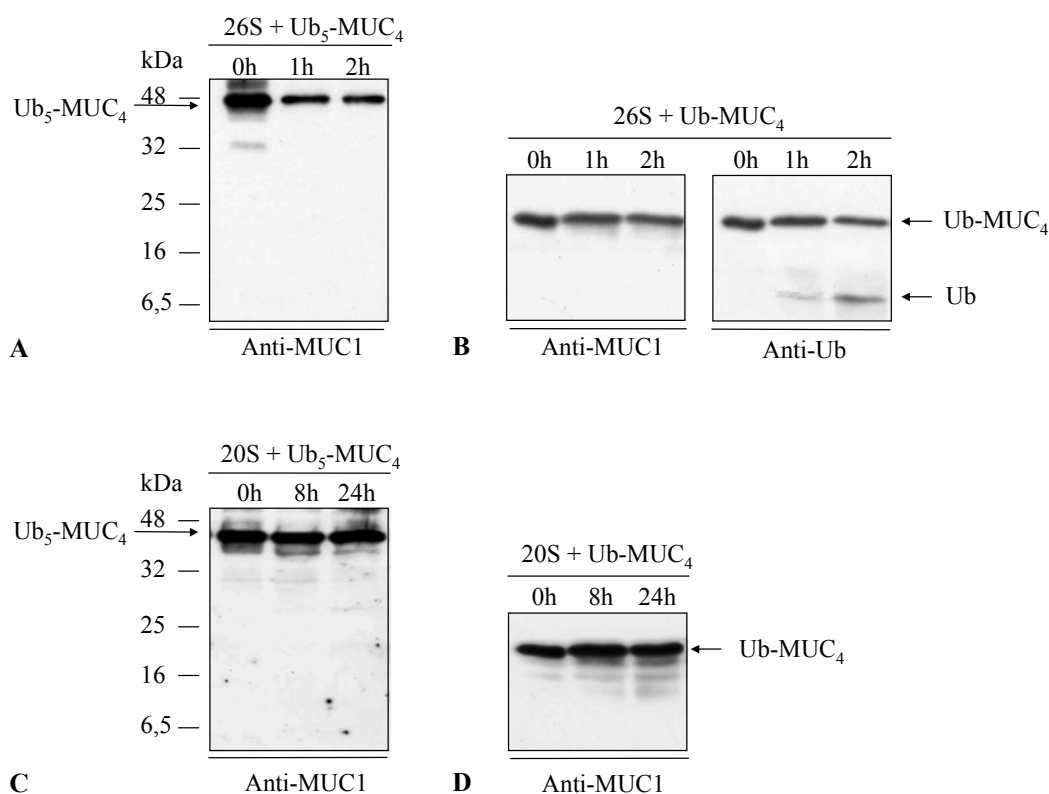


Abb. 20: Kontrollansätze zur Bestätigung, dass für die proteasomale Prozessierung von Ub₅-MUC₄ sowohl das 26S Proteasom als auch die Präsenz der Ub₄-Gruppe im Substrat essentiell sind. (A und B) 26S Proteasomen (30nM) wurden in einem Tris-gepufferten und ATP-regenerierenden System für 24h bei 37°C mit (A) Ub₅-MUC₄ (300nM) bzw. (B) dem Fusionsprotein Ub-MUC₄ (300nM) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten entnommene Proben wurden mittels Western Blots analysiert. Die Proteindetektion erfolgte mit den angegebenen Antikörpern. (C und D) Die Inkubation der Substrate (C) Ub₅-MUC₄ (300nM) und (D) Ub-MUC₄ (300nM) mit dem 20S Proteasom (30nM) wurde analog durchgeführt. Die Ansätze enthielten allerdings kein ATP. Die Analyse der zu den angegebenen Zeitpunkten entnommenen Proben erfolgte mittels Western Blots und den aufgeführten Antikörpern.

Zunächst war zu überprüfen, ob eine Veränderung des Substrates Ub₅-MUC₄ hinsichtlich seiner Länge, der Aminosäuresequenz und Konformation die Bindung an und den Umsatz durch das 26S Proteasom beeinflusst. Dazu wurden die MUC1-Derivate Ub₅-MUC₈ und Ub₅-MUC_{long} *in vitro* generiert. Diese verfügen über einen 72 bzw. 88 Aminosäuren langen MUC1-Anteil, der im Fall von Ub₅-MUC₈ das Mucin1-Epitop p950-958 achtmal in Folge und im Fall von Ub₅-MUC_{long} einmal das Epitop im natürlichen Mucin1-Kontext (Mucin1 p938-1025) enthält.

3.1.7 Die Substrate Ub₅-MUC₈ und Ub₅-MUC_{long} und deren proteasomale Prozessierung *in vitro*

Abb. 21A und 21C zeigen die Substrate Ub₅-MUC₈ und Ub₅-MUC_{long} schematisch, Abb. 21B und 21D nach deren *in vitro* Generierung.

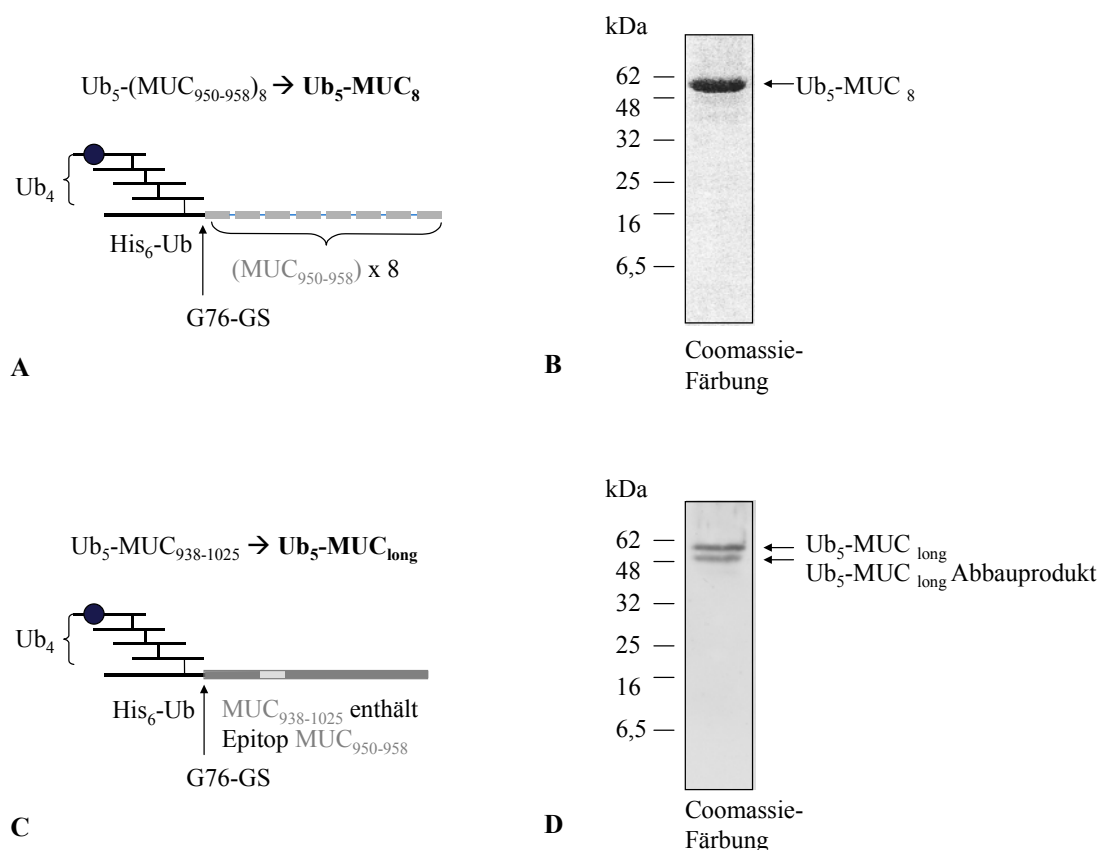


Abb. 21: Darstellung von Ub₅-MUC₈ sowie Ub₅-MUC_{long} schematisch und nach rekombinanter Generierung mittels SDS-PAGE. (A) Ub₅-MUC₈ und (C) Ub₅-MUC_{long} entstanden durch Konjugation von Ub₄ mit den Fusionsproteinen Ub-MUC₈ bzw. Ub-MUC_{long}, die über eine NH₂-terminale His₆-Markierung verfügen und zwischen UbG76 und dem Beginn des MUC1-Bereichs eine Insertion der Aminosäuren Glycin und Serin aufweisen. (B und D) Die Reinheit der jeweiligen Proteine zeigte sich nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.

Beide Substrate wurden vom 26S Proteasom prozessiert (Abb. 22A und B/C). Eine Substratabnahme war bereits nach einer Stunde Inkubation festzustellen. Dabei waren insbesondere im Fall des Ub₅-MUC₈ deubiquitinierte Produkte detektierbar, die zum Zeitpunkt 2h nur noch in reduzierter Menge vorlagen (Abb. 22A). Der Umsatz des Ausgangssubstrates sowie der entstandenen deubiquitinierten Stufen ließ sich mit Apyrase aufhalten und zeigt damit die Abhängigkeit der Prozessierung von ATP. Der Einsatz von MG132 führte zur Stabilisierung des Fusionsproteins, wie es schon im Abbauxperiment mit Ub₅-MUC₄ (Abb. 19A) beobachtet werden konnte. Die gleichen Abhängigkeiten gelten für die Degradation des Substrates Ub₅-MUC_{long} (Abb. 22B und C). Allerdings waren hier weniger deubiquitinierte Intermediate erkennbar. Nur in den Ansätzen mit Apyrase bzw. MG132, die eine fast vollständige bzw. anteilige Substratstabilisierung zeigten, waren erwartungsgemäß die komplett deubiquitinierte Form MUC_{long} sowie das Fusionsprotein Ub-MUC_{long} detektierbar (Abb. 22C).

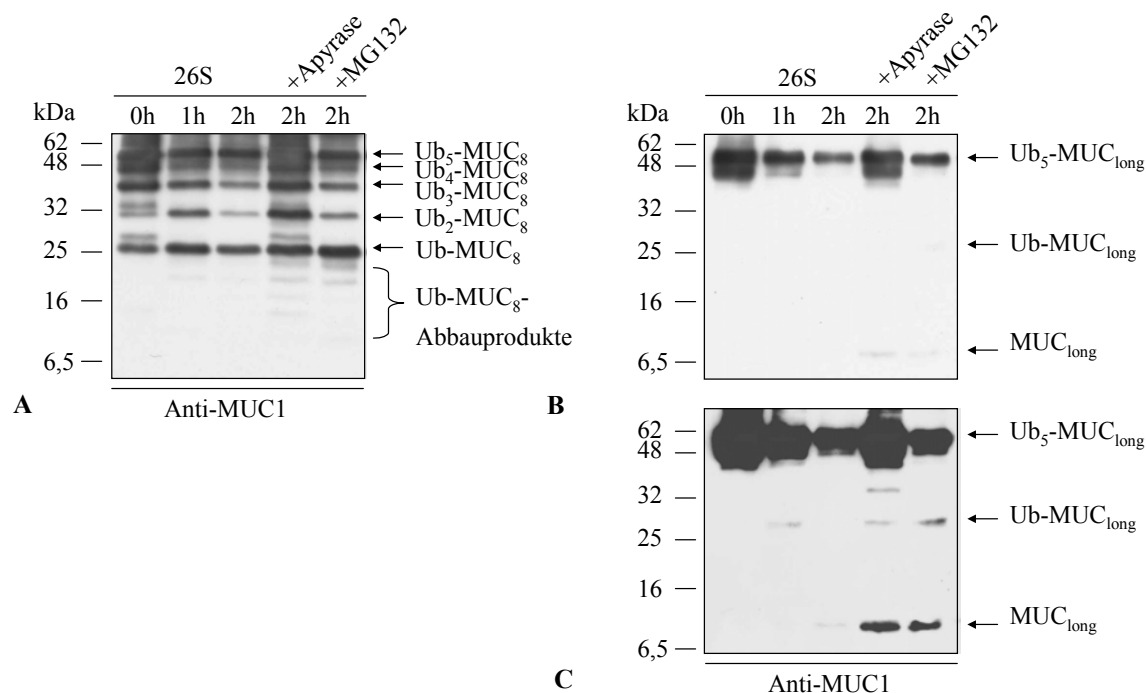


Abb. 22: *In vitro* Abbau von Ub₅-MUC₈ und Ub₅-MUC_{long} durch das 26S Proteasom und Abbau-Hemmung mit Proteasom-Inhibitoren. Die 26S Prozessierungsexperimente mit den Substraten **(A)** Ub₅-MUC₈ bzw. **(B)** Ub₅-MUC_{long} wurden analog zu denen mit dem Substrat Ub₅-MUC₄ durchgeführt (Kapitel 3.1.6). Die zu den angegebenen Zeitpunkten entnommenen Proben wurden mittels Western Blots und dem Anti-MUC1-Antikörper analysiert. In den Inhibitor-enthaltenden Ansätzen erfolgte eine Vorinkubation des 26S Proteasoms mit dem jeweiligen Hemmstoff (100µM MG132, 25U/mL Apyrase) für 15min bei 37°C. **(C)** Abb. 22C zeigt den Western Blot aus Abb. 22B nach längerer Exposition.

Die von K. Janek ausgeführte Etablierung einer massenspektrometrischen Methode zur Identifizierung der Fragmente, die in den *in vitro* Abbauxperimenten mit den MUC1-Derivaten entstanden sind, erwies sich als schwierig. Die Methode sollte einerseits erlauben, Proben mit einem hohen Protein- und Salzgehalt sowie einem 5%igen Anteil an Glycerol zu analysieren und andererseits sensitiv genug sein, um auch Produkte in femtomolarer Konzentration zu detektieren. Es gelang, alle Ansätze mittels MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie (MALDI-MS) zu vermessen und die aus dem jeweiligen Massenspektrum ersichtlichen Signale über die Bestimmung des Masse/Ladung-Verhältnisses den jeweiligen Fragmenten zuzuordnen. Eine Bestätigung der Zuordnungen erfolgte über die Probenanalyse mittels sensitiver HPLC-MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie (HPLC-MALDI-MS). Diese Methode ermöglicht durch zusätzliche Fragmentierung der Abbauprodukte und deren Analyse (Tandem-MS) die eindeutige Identifizierung der Peptide. Die Analyse der Proben mittels HPLC-MALDI-MS führte allerdings trotz einer initialen Vorreinigung, mit der Salze und Glycerol aus der Probe entfernt wurden, wiederholt zu technischen Defekten während der Chromatographie. Aus diesem Grund konnte eine Produktidentifizierung über HPLC-MALDI-MS nur für die Ansätze mit den Polyepitop-Substraten vorgenommen werden. Stellvertretend für die Polyepitop-Substrate ist in

Abb. 23 die massenspektrometrische Auswertung der *in vitro* Prozessierung des Substrates Ub₅-MUC₄ durch das 26S Proteasom dargestellt. In die Schnitkarte wurden nur die dominanten Produkte, also Fragmente aufgenommen, die wiederholt und in signifikanter Menge nachweisbar waren. Unter diesen Produkten befinden sich Peptide sowohl aus dem Ub-Bereich als auch aus dem Mucin1-Anteil. Zu den Fragmenten aus dem letztgenannten Bereich gehört u.a. das MUC1-Epitop p950-958 STAPPVHNV (roter Balken). Markant ist zudem der DUB-vermittelte Schnitt nach dem Doppel-Glycin-Motiv (Position G75G76 im Ubiquitin, Position G89G90 im Fusionsprotein), der zur Freisetzung des Produktes GS-MUC₄ (grüner Balken) führte und den NH₂-Terminus der Doppel- bzw. Dreifachepitop-Vorläufer generierte (gelbe Balken).

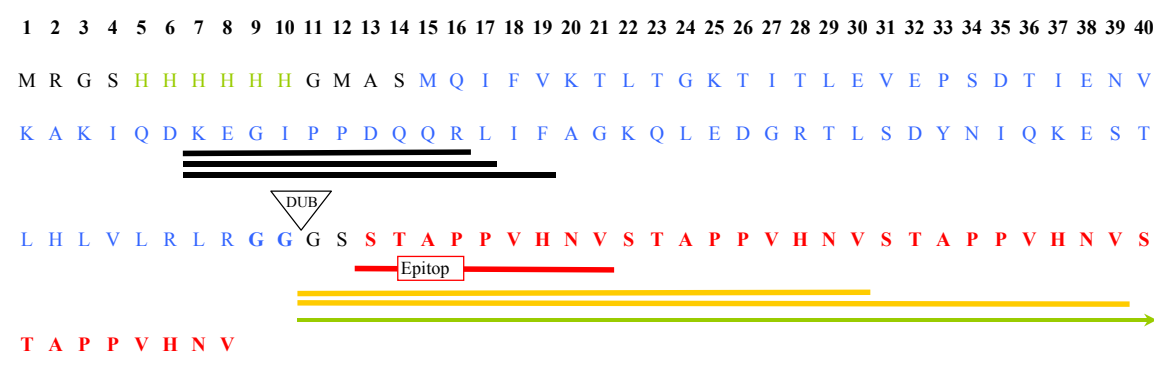


Abb. 23: Schnittkarte zum Substrat Ub₅-MUC₄ nach 26S proteasomalem Abbau. Es sind die dominanten Fragmente dargestellt, die zum Zeitpunkt 15min nach *in vitro* Degradation von Ub₅-MUC₄ durch das 26 Proteasom entstanden sind und per MALDI-MS und HPLC-MALDI-MS identifiziert wurden. Die Farbe der Buchstaben, die die Aminosäuresequenz des Fusionsproteins Ub-MUC₄ repräsentieren, zeigt die Zugehörigkeit zur His₆-Markierung (grün), zum Ub-Anteil (blau), zum Mucin-Anteil (rot). Die Querbalken geben die massenspektrometrisch ermittelten Degradationsfragmente wieder. Dabei entspricht der rote Balken dem Epitop, die gelben Balken Epitop-Vorläufern, der grüne Balken dem durch Deubiquitinierung entstandenen GS-MUC₄-Produkt. Das Dreieck zeigt den DUB-typischen Schnitt nach G75G76 im Ub-Anteil. Der Pfeil weist auf die Fortführung des Balkens in der nächsten Zeile hin.

Die massenspektrometrische Analyse der aus der 26S proteasomalen *in vitro* Degradation des Substrates Ub₅-MUC_{long} hervorgegangenen Produkte wurde durch die Messung der Proben mit dem MALDI-TOF/TOF vorgenommen. Die Zuordnung der Massensignale zu den Substratfragmenten erfolgte zum einen unter Zuhilfenahme der substratspezifischen GPMW32-Datenbank über die Bestimmung des Masse/Ladung-Verhältnisses und zum anderen über den Nachweis, dass die den Ub₅-MUC_{long}-Produkten zugeordneten Massensignale keinem Fragment der Kreatinkinase entsprachen, die neben dem Mucin1-Substrat als einziger Bestandteil des Degradationsansatzes ebenfalls proteasomal degradierbar war. Auf Grundlage dieser Daten und unter zusätzlicher Berücksichtigung der durch Tandem-MS zu den Polyepitop-Substraten identifizierten Spaltstellen sowie ermittelten Spalthäufigkeiten wurden die Massenspektren ausgewertet. Die Abb. 24 zeigt die Schnittkarte zum Substrat Ub₅-MUC_{long}, die die nach 26S proteasomaler *in vitro* Degradation des Substrates erhaltenen dominanten Fragmente wiedergibt. Wie auch im Abbauxperiment mit dem Substrat Ub₅-MUC₄ war das MUC1-Epitop proteasomal generiert worden und zudem ein NH₂-terminal verlängerter Epitop-Vorläufer nachzuweisen. Ebenfalls war der sehr dominante Schnitt nach dem Doppel-Glycin-Motiv (G75G76) detektierbar, der zur Entstehung von Fragmenten der Längen 20, 21 bzw. 23 AA sowie zur

Bildung des GS-MUC_{long}-Produktes führte. Letztgenanntes Peptid konnte bereits mittels Western Blots nach MG132-vermittelter Stabilisierung nachgewiesen werden (Abb. 22C). Der Schnitt nach dem UbG75G76-Motiv ist für DUBs typisch und wurde im *in vitro* Prozessierungsansatz sehr wahrscheinlich von Rpn11, der 26S intrinsischen Zn²⁺-abhängigen DUB oder dem proteasomassoziierten Protein USP14/Ubp6 ausgeführt (Guterman & Glickman, 2004a; Verma *et al.*, 2002; Yao & Cohen, 2002). Daneben zeigt die Schnitkarte, dass auch Ub proteasomal degradiert wurde.

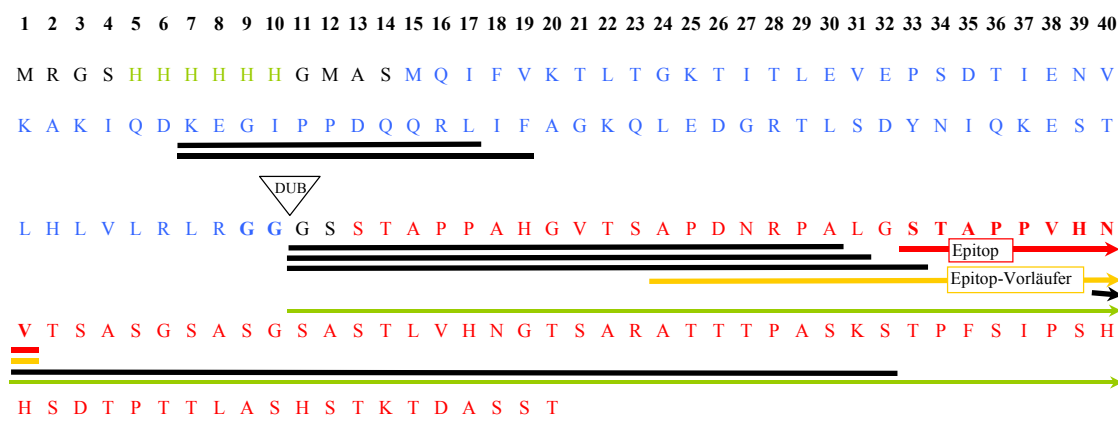


Abb. 24: Schnittkarte zum Substrat Ub₅-MUC_{long} nach 26S proteasomalem Abbau. Es sind die dominanten Fragmente dargestellt, die zum Zeitpunkt 15min nach *in vitro* Degradation von Ub₅-MUC_{long} durch das 26 Proteasom entstanden sind und per MALDI-MS ermittelt und mittels einer substratspezifischen GPMW32-Datenbank bestätigt wurden. Die Farbe der Buchstaben, die die Aminosäuresequenz des Fusionsproteins Ub-MUC_{long} repräsentieren, zeigt die Zugehörigkeit zur His₆-Markierung (grün), zum Ub-Anteil (blau), zum Mucin1-Anteil (rot). Die Querbalken geben die massenspektrometrisch ermittelten Degradationsfragmente wieder. Dabei entspricht der rote Balken dem Epitop, der gelbe Balken einem Epitop-Vorläufer, der grüne Balken dem durch Deubiquitinierung entstandenen GS-MUC_{long}-Produkt. Das Dreieck zeigt den DUB-typischen Schnitt nach G75G76 im Ub-Anteil. Die Pfeile weisen auf die Fortführung der Balken in der nächsten Zeile hin.

3.2 VERGLEICHENDE ANALYSE DER PROZESSIERUNG DER PENTA-UBIQUITINIERTEN MUCIN1-DERIVATE

Die Analyse der proteasomalen *in vitro* Prozessierung der Mucin1-basierten Substrate Ub₅-MUC₄, Ub₅-MUC₈ und Ub₅-MUC_{long} mittels Western Blots hatte ergeben, dass die genannten Proteine Modellsubstrate für das 26S Proteasom darstellen. Der Vergleich der einzelnen Prozessierungsexperimente mit Hilfe der aus den Western Blot-Analysen gewonnenen sowie den massenspektrometrisch ermittelten Daten sollte darüber Aufschluss geben, ob substratspezifische bzw. substratübergreifende Prozessierungsmuster des 26S Proteasoms erkennbar sind und ob die in der vorliegenden Arbeit etablierte *in vitro* Abbaumethode ein geeignetes Testsystem für die 26S proteasomale Prozessierung ubiquitiniertter epitopbasierter Substrate darstellt.

In Tab. 5 sind die durch beide Analysemethoden erhaltenen Resultate zusammengestellt. Für die drei untersuchten MUC1-Derivate gilt, dass die Ergebnisse aus Western Blot und Massenspektrometrie in ihrer Tendenz übereinstimmen und eine Korrelation zwischen der Stärke der Substratabnahme und jener der Produktentstehung besteht.

Tab. 5: Vergleich der mittels Western Blot und Massenspektrometrie erhaltenen Daten zu den Abbauxperimenten mit den MUC1-Derivaten. Die Tabelle gibt einen Überblick über den Umfang von Substratumsatz und generierten Produkten, die bei der *in vitro* Prozessierung der Substrate Ub₅-MUC₄, Ub₅-MUC₈ und Ub₅-MUC_{long} durch das 26S Proteasom entstanden sind. Grundlage für die massenspektrometrische Analyse waren Degradationsansätze nach 15min Inkubation, für den Western Blot nach 1h Inkubation. Die Höhe der Substratabnahme bzw. der Produktquantität wird durch folgende Symbolik wiedergegeben: +: schwach, ++: mittel, +++: stark, -: Produkt nicht möglich, ?: Produkt wegen methodischer Limitierung nicht nachweisbar. MS: Massenspektrometrie, WB: Western Blot, GS-MUC_x: durch DUBs entstandene Produkte GS-MUC_{4/8/long}

| Eingesetztes Substrat | Ub ₅ -MUC ₄ | | Ub ₅ -MUC ₈ | | Ub ₅ -MUC _{long} | |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----|-----------------------------------|-----|--------------------------------------|-----|
| Analysemethode | MS | WB | MS | WB | MS | WB |
| Substratabnahme | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ |
| Freisetzung von: | | | | | | |
| Ub ₅ | +++ | +++ | + | +++ | ++ | ++ |
| GS-MUC _x | ++ | ? | ++ | ? | ++ | + |
| Ub-Fusionsprotein | + | + | + | ++ | + | + |
| Generierung von: | | | | | | |
| Epitop | ++ | ? | ++ | ? | + | ? |
| Zweifachepitop/GS-Zweifachepitop | + | ? | ++ | ? | - | - |
| Dreifachepitop/GS-Dreifachepitop | + | ? | + | ? | - | - |

Der quantitative Vergleich der massenspektrometrischen Daten erfolgte unter Zuhilfenahme eines in allen Massenspektren auftretenden substratfremden Signals. Die Berücksichtigung dieses Referenzsignals ermöglichte eine Abschätzung der quantitativen Unterschiede zwischen den jeweiligen Produktspektren. Die drei Substrate wurden ähnlich gut umgesetzt, wobei in jedem Fall durch Deubiquitinierung Ub₅, GS-MUC_x bzw. das Fusionsprotein entstanden. Daneben waren proteasomale Degradationsfragmente detektierbar, unter denen sich immer das Epitop und bei den beiden Polyepitop-Substraten auch Zweifach- und Dreifachepitop befanden. Die Menge generierten Epitops war erwartungsgemäß in den Prozessierungsexperimenten mit den Polyepitop-Substraten erhöht. Diese Substrate eignen sich daher besonders gut für Analysen, die eine Charakterisierung des 26S Proteasoms hinsichtlich der Produktquantität ermöglichen sollen. Wird dagegen eine Untersuchung zur Produktqualität angestrebt, bieten sich proteasomale Degradationsexperimente mit dem Substrat Ub₅-MUC_{long} an.

Tab. 6 gibt Aufschluss über die Art der Aminosäuren in den P1-Positionen, die anhand der nach proteasomaler Prozessierung von Ub₅-MUC₄, Ub₅-MUC₈ bzw. Ub₅-MUC_{long} entstandenen Fragmente massenspektrometrisch nachgewiesen wurden. Demnach erfolgten bei den Polyepitop-Substraten 57%-60% der Gesamtschnitte nach hydrophoben bis polaren Aminosäuren, während nach der proteasomalen Degradation von Ub₅-MUC_{long} etwa 20% mehr, also 77% der gesamten P1-Positionen auf hydrophobe bis polare Aminosäuren entfielen. Der Vergleich der Prozessierungsexperimente hinsichtlich der Länge der entstandenen Fragmente zeigte für alle Ansätze die Freisetzung von Peptiden der Länge 9-14 AA, 18-23 AA und 28-33 AA. Dabei waren in den Ansätzen mit den Polyepitop-Substraten erwartungsgemäß besonders häufig Produkte in und um Epitopgröße (9-11 AA) detektierbar.

Tab. 6: Vergleich der zu den Abbauxperimenten mit den MUC1-Derivaten massenspektrometrisch gewonnenen Daten hinsichtlich der P1-Positionen. Die P1-Positionen sind anhand der verschiedenen identifizierten dominanten Produkte ermittelt worden, die in den *in vitro* Prozessierungsexperimenten mit den Substraten Ub₅-MUC₄, Ub₅-MUC₈ und Ub₅-MUC_{long} durch das 26S Proteasom entstanden sind. Die durch DUBs ausgeführte Spaltung nach G75G76 wurde nicht berücksichtigt. Es ist die Häufigkeit der an den P1-Positionen befindlichen Aminosäuren angegeben, die den entsprechenden proteasomalen Spaltpräferenzen zugeordnet wurden. Schnitte nach den AA Ser, Thr und Met sind für das Enzym Elastase typisch und wurden daher der Spaltpräferenz Elastase-ähnlich (Elastase-L) zugeordnet. AA: Aminosäuren, P1: P1-Position, BrAAP: Spaltpräferenz nach verzweigtkettigen Aminosäuren und SNAAP: Spaltpräferenz nach kleinen, neutralen Aminosäuren (Orlowski *et al.*, 1993), ChT-L: Chymotrypsin-ähnlich, Caspase-L: Caspase-ähnlich, PGPH: Peptidylglutamyl-Peptidhydrolase, T-L: Trypsin-ähnlich

| Substrat | Ub ₅ -MUC ₄ | Ub ₅ -MUC ₈ | Ub ₅ -MUC _{long} |
|--|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Anzahl an hydrophoben bis polaren AA in P1: | | | |
| ChT-L/BrAAP: Phe, Leu, Ile, Val, Asn | 5 | 5 | 5 |
| SNAAP: Gly, Ala | 0 | 1 | 2 |
| Elastase-L: Ser, Thr, Met | 1 | 2 | 3 |
| Gesamtanzahl hydrophober-polarer AA in P1: | 6 | 8 | 10 |
| Anteil hydrophober-polarer P1 an Gesamt-P1: | 60% | 57% | 77% |
| Anzahl an geladenen AA in P1: | | | |
| Caspase-L: Asp | 3 | 5 | 2 |
| PGPH: Glu | 0 | 0 | 0 |
| Trypsin-L: Arg, Lys, His | 1 | 1 | 1 |
| Gesamtanzahl geladener AA in P1: | 4 | 6 | 3 |
| Anteil geladener P1 an Gesamt P1: | 40% | 43% | 23% |

Die vergleichende Analyse der Prozessierungsexperimente hat herausgestellt, dass die drei rekombinant gewonnenen ubiquitinierten MUC1-basierten Substrate sehr effizient vom 26S Proteasom umgesetzt wurden und – wie erwartet – die Menge generierten Epitops mit der Anzahl der Epitope im Substrat korrelierte. Diese Daten bestätigen die Eignung des *in vitro* Degradationssystems zur Charakterisierung des 26S Proteasoms mit Hilfe ubiquitinierten MUC1-Derivate. Mit dieser Methode lässt sich z.B. der Einfluss von Modulatoren auf die 26S proteasomale Substratprozessierung und damit auf die Produktgenerierung untersuchen. Daneben ermöglicht das System, die Effizienz des 26S Proteasoms zu ermitteln, mit der Epitope aus potentiellen peptidbasierten Polyepitop-Vakzinen generiert werden.

3.3 DER EINFLUSS DER PENTA-UBIQUITINIERTEN E7- BZW. MUCIN1-SUBSTRATE AUF DIE PEPTIDSPALTENDE AKTIVITÄT DES 26S PROTEASOMS

Die folgenden Experimente sollten klären, warum die Mucin1-basierten Substrate, aber nicht Ub₅G76-E7 *in vitro* vom 26S Proteasom degradiert wurden. Die proteasomalen *in vitro* Abbauxperimente mit Ub₅G76-E7 hatten gezeigt, dass nur ein geringer Anteil des Substrates umgesetzt wurde. Diese Substratabnahme ging allerdings ausschließlich auf Deubiquitinierung zurück, die zur Freisetzung von Ub₅ und dem E7-Protein führte (Kapitel 3.1.5).

Möglicherweise war durch die Anwesenheit des E7-Proteins die Anlagerung von Ub₅G76-E7 an die typischen Substrat-Bindungsstellen am 19S-Komplex beeinträchtigt. Die Eigenschaft des HPV E7-Proteins, die proteasomale 19S Untereinheit Rpt2 zu binden, könnte dabei dem eigenen Abbau abträglich gewesen sein (Berezutskaya & Bagchi, 1997). Um zu testen, ob sich die Substrate Ub₅-MUC₄ und Ub₅G76-E7 in ihrer Fähigkeit, das Proteasom bzw. proteasomale Subkomplexe zu binden, unterscheiden, wurde eine Interaktionsstudie mittels Glycerolgradienten-Zentrifugation der entsprechenden Inkubationsansätze (26S mit Ub₅-MUC₄ bzw. Ub₅G76-E7) durchgeführt (Abb. 25).

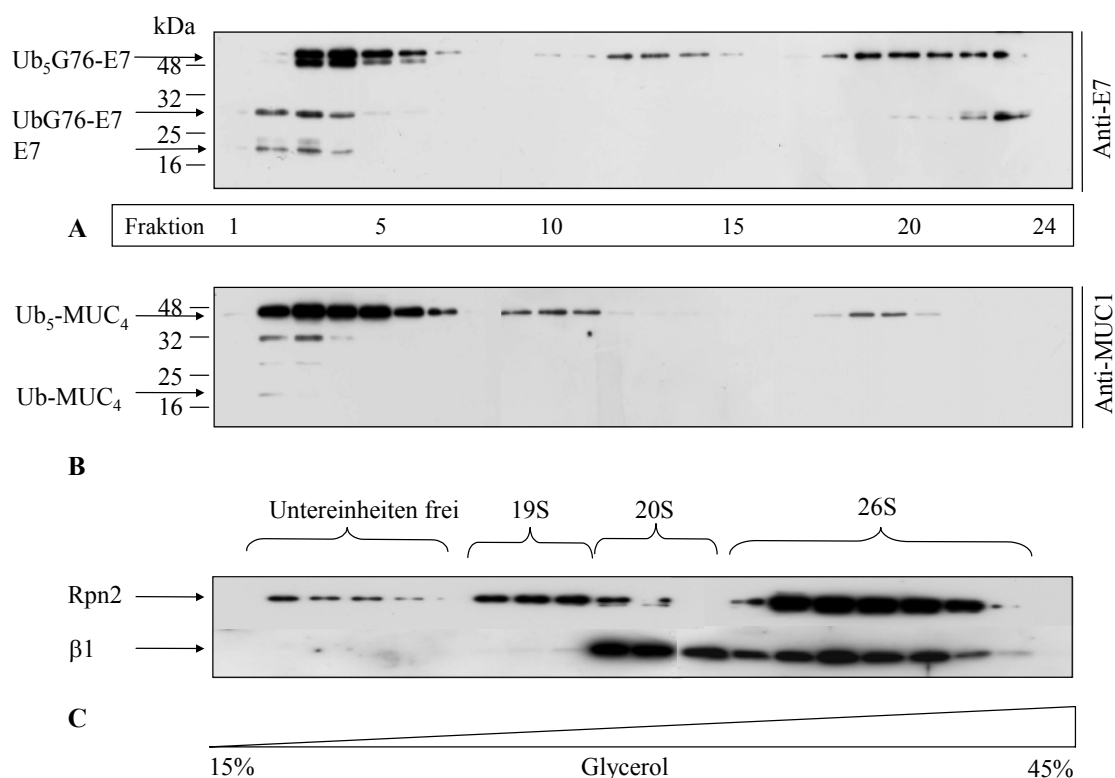


Abb. 25: Bindung von Ub₅G76-E7 bzw. Ub₅-MUC₄ an das 26S Proteasom und dessen Subkomplexe. (A bis C) Glycerolgradienten (15%-45%) wurden mit Ansätzen beladen, in denen in einem Tris-gepufferten und ATP-regenerierenden System 26S Proteasomen mit dem Substrat **(A)** Ub₅G76-E7 bzw. **(B)** Ub₅-MUC₄ für 15min bei 37°C inkubiert worden waren. Die nach Ultrazentrifugation erhaltenen Fraktionen wurden mittels Western Blots auf das Vorhandensein des jeweiligen Substrates bzw. **(C)** auf die Präsenz der 20S Untereinheit β1 und der 19S Untereinheit Rpn2 geprüft.

Als Referenz für die Verteilung der proteasomalen (Sub-)Komplexe auf die Fraktionen diente der unter Abb. 25C analysierte Glycerolgradient. Die Untersuchung zeigt, dass beide Substrate – da sie im Überschuss zugegeben wurden – frei vorkommen oder an den 26S-Komplex gebunden sind. Während allerdings Ub₅-MUC₄ erwartungsgemäß auch in den Fraktionen detektiert wurde, die den 19S-Komplex enthalten, war Ub₅G76-E7 besonders stark nur noch in den Fraktionen mit den 20S *core*-Partikeln vertreten. Diese ungewöhnliche co-Fraktionierung des Substrates Ub₅G76-E7 mit dem 20S-Komplex ist ein Hinweis auf eine Interaktion zwischen Ub₅G76-E7 und der proteolytisch aktiven Komponente des 26S Proteasoms, die die proteasomale Aktivität möglicherweise negativ beeinflusst.

Um dies zu überprüfen, wurden die entsprechenden Inkubationsansätze zum Zeitpunkt 15min einer Nativ-Gelelektrophorese unterzogen und die peptidspaltende Aktivität des Proteasoms mittels Suc-LLVY-*overlay* bestimmt (Abb. 26A).

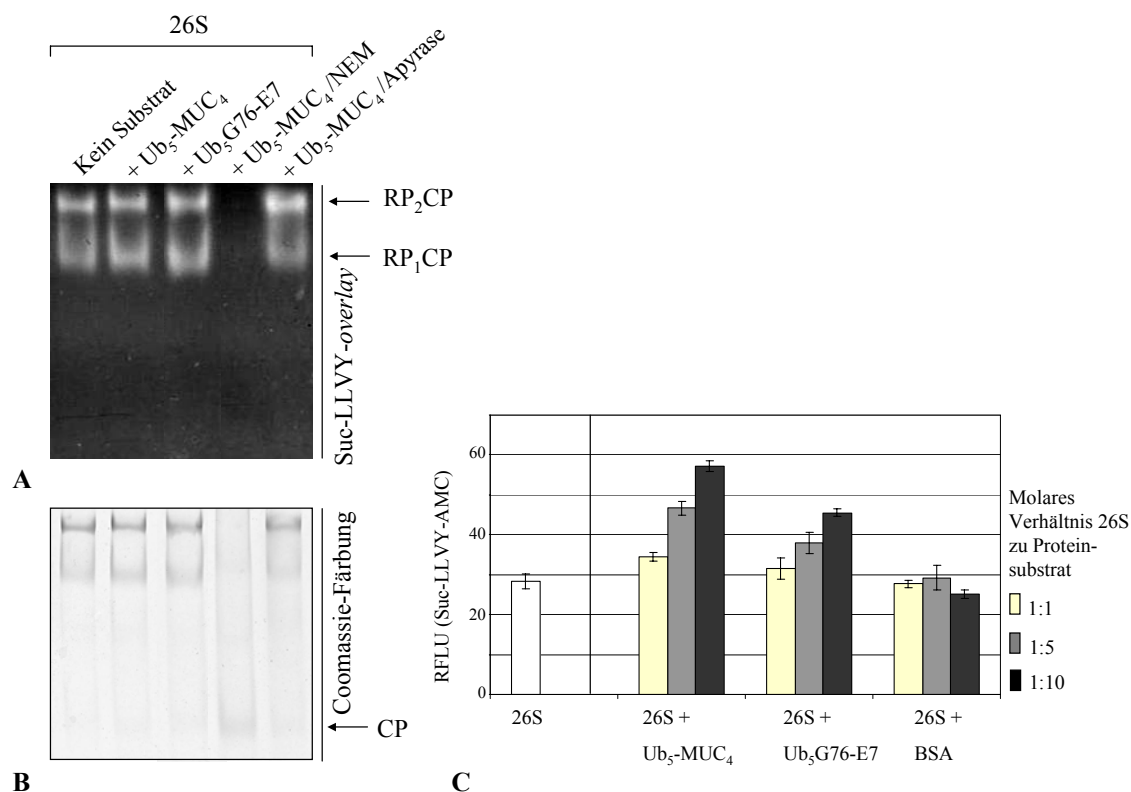


Abb. 26: Analyse des Einflusses der Proteinsubstrate auf die ChT-L Aktivität des 26S Proteasoms. (A und B) Ansätze mit 26S Proteasomen (30nM) und den Substraten Ub₅G76-E7 bzw. Ub₅MUC₄ (300nM) in einem Tris-gepufferten, ATP-regenerierenden System mit/ohne NEM (5mM) oder Apyrase (25U/ml) wurden nach 15min Inkubation bei 37°C einer Nativ-PAGE unterzogen. Die so getrennten 26S-Komplexe wurden mittels (A) eines Suc-LLVY-AMC-overlays (100μM) bzw. (B) einer Coomassie-Färbung analysiert. (C) Ansätze mit 30nM 26S Proteasomen und 30nM (hell)/ 150nM (grau)/ 300nM (schwarz) Ub₅-MUC₄, Ub₅G76-E7 bzw. BSA in einem Tris-gepufferten, ATP-regenerierenden System wurden für 15min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die peptidspaltende Aktivität ChT-L der 26S Proteasomen im Aktivitätstest mit dem fluorogenen Peptid Suc-LLVY-AMC (100μM) ermittelt. Das Diagramm zeigt die aus drei unabhängigen Experimenten erhaltenen und gemittelten Daten. Die Standardabweichungen sind angegeben. BSA: Bovines Serum Albumin

Verglichen mit dem Ansatz ohne Proteinsubstrat war auch für die Proteasomen mit Ub₅-MUC₄ bzw. Ub₅G76-E7 keine Beeinträchtigung festzustellen. Im Gegenteil, es konnte im Nativ-Gel eine leichte Stimulierung der peptidspaltenden Aktivität des zweifach (RP₂CP) und in größerem Maße des einfach-„gecappten“ 26S Proteasoms (RP₁CP) beobachtet werden. Die anschließende Coomassie-Färbung deutete zudem an, dass sich die Menge an RP₁CP – vermutlich durch Zerfall von RP₂CP – nach Substratzugabe erhöhte. Dieser Hinweis wurde in Kapitel 3.6 weiterverfolgt. Apyrase inhibierte die Stimulierung des einfach „gecappten“ RP₁CP-Komplexes (Abb. 26A, B). Der Einsatz von 5mM des alkylierenden Agens NEM führte dagegen zur Zerstörung des 26S Proteasoms.

Das mittels Nativ-PAGE gewonnene Ergebnis war im Aktivitätstest reproduzierbar (Abb. 26C). Diesem zufolge ist der proteasomstimulierende Effekt an die Anwesenheit der Substrate Ub₅-MUC₄ und Ub₅G76-E7 gebunden und besteht eine Korrelation zwischen der Intensität des Effektes und der Substratkonzentration. Die Aktivierung durch das Protein Ub₅-MUC₄ fiel dabei weit deutlicher aus als die von Ub₅G76-E7 vermittelte. Die Stimulierung wurde nicht durch das Kontrollprotein BSA verursacht.

3.3.1 Einfluss des MUC1-Anteils der Substrate auf die Proteasomaktivität

Da der Effekt der Proteasomstimulierung von den ubiquitinierten Substraten, nicht aber von dem Protein BSA ausging, war eine Abhängigkeit der Aktivierung von der Art des Substrates anzunehmen. Im Folgenden sollte geklärt werden, welcher Bereich des Substrates für die Stimulierung essentiell und ob der Effekt für das 26S Proteasom spezifisch ist. Denn Schmidtke *et al.* und Kisselev *et al.* haben bereits für das 20S Proteasom zeigen können, dass die Bindung hydrophober Peptidsubstrate an postulierte *modifier sites* allosterisch zu einer stimulierten Peptidhydrolyse führen kann, die vermutlich auf einem *gating*-Effekt basiert (Kisselev *et al.*, 2002; Schmidtke *et al.*, 2000). Um die Voraussetzungen für die durch die Proteinsubstrate Ub₅-MUC₄ und Ub₅G76-E7 induzierte Proteasomstimulierung zu ermitteln, wurde exemplarisch der Einfluss der hydrophoben MUC1-Peptide MUC₁ (1x Epitop₉₅₀₋₉₅₈) und MUC₃ (3x Epitop₉₅₀₋₉₅₈) sowie der Effekt des Fusionsproteins Ub-MUC₄ auf die peptidspaltende Aktivität von 20S und 26S Proteasomen überprüft.

Abb. 27A dokumentiert, dass weder die vom 20S Proteasom nicht abbaubaren Substrate Ub₅-MUC₄ und Ub-MUC₄ (Kapitel 3.1.6, Abb. 20), noch das vom 20S Proteasom prozessierbare Dreifachepitop MUC₃ bzw. das Produkt MUC₁ zur Proteasomaktivierung in der Lage waren.

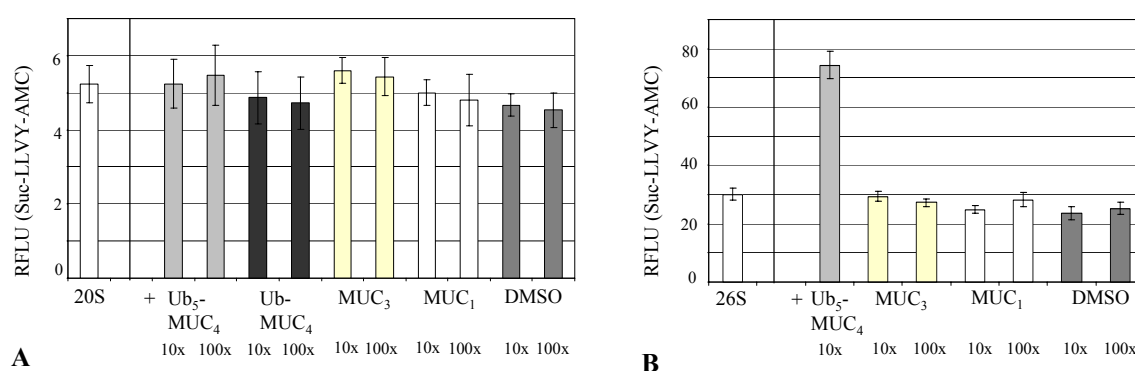


Abb. 27: Einfluss hydrophober Peptide auf die Proteasomaktivität. (A) 20S Proteasomen (30nM) in einem Tris-gepufferten System bzw. (B) 26S Proteasomen (30nM) in einem Tris-gepufferten und ATP-regenerierenden System wurden mit den angegebenen Substraten in 10fach molarem Überschuss (300nM) bzw. 100fach molarem Überschuss (3μM) für 15min bei 37°C inkubiert und einem Aktivitätstest mit 100μM Suc-LLVY-AMC unterzogen. Die Diagramme zeigen die aus drei unabhängigen Experimenten erhaltenen und gemittelten Daten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Die Bindung bzw. Hydrolyse der hydrophoben Peptide MUC₁ und MUC₃ durch das 20S Proteasom führte demnach nicht zu einer Proteasomstimulierung. Auch die Inkubation des 26S Proteasoms mit den Peptiden MUC₁, MUC₃ wie auch dem Ub-MUC₄-Fusionsprotein verursachte keine Steigerung der 26S peptidspaltenden Aktivität (Abb. 27B).

Den Daten zufolge liegt der in der vorliegenden Arbeit eruierten substratinduzierten Proteasomaktivierung nicht der von Schmidtke *et al.* beobachtete und über postulierte *modifier sites* am 20S Proteasom vermittelte proteasomstimulierende Effekt zugrunde. Erstgenannte ist an die Anwesenheit eines funktionellen 26S Proteasoms und eines ubiquitinierten Substrates gebunden, was als Hinweis gewertet werden kann, dass der aktivierende Effekt mit der Prozessierung ubiquitiniierter Substrate verknüpft ist.

3.3.2 Kinetik des proteasomstimulierenden Effektes durch Ub₅-MUC₄

Um herauszufinden, welcher Schritt der proteasomalen Substratprozessierung – von der initialen Substratbindung bis zur finalen Produktfreisetzung – zur Proteasomstimulierung führt, wurde zunächst eine kinetische Analyse des stimulierenden Effektes vorgenommen. Das Diagramm in Abb. 28A zeigt drei Graphen, die die Suc-LLVY-AMC spaltende Proteasomaktivität vom 26S Proteasom (Karo), vom 26S mit Ub₅-MUC₄ in einem molaren Verhältnis von 1:5 (Vierteck) bzw. 1:10 (Dreieck) im Zeitverlauf wiedergeben. Die Verwendung des fluorogenen Substrates Suc-LLVY-AMC ermöglicht im peptidspaltenden System die Bestimmung der Chymotrypsin-ähnlichen (ChT-L) Aktivität, von der angenommen wird, dass sie die Hauptaktivität darstellt. Die in Abb. 28A dargestellten drei Graphen weisen bis zum Zeitpunkt 90min einen linearen Verlauf mit positiver Steigung auf, die danach kontinuierlich abnimmt und zum Zeitpunkt 300min gleich null ist. Die Anstiegsabnahme spiegelt eine generelle sich reduzierende Proteasomaktivität wider, die auf einer Beeinträchtigung des 26S Proteasoms – möglicherweise durch seinen Zerfall in Subkomplexe – beruht. Ein solcher Zerfall wäre als Resultat des Substratumsatzes denkbar.

Die Proteasomaktivitäten der Substrat-enthaltenden Ansätze waren final 50 bzw. 100 RFLU höher als die in der Reaktion ohne Ub₅-MUC₄. Dieser Erhöhung lag eine Aktivitätsstimulierung zugrunde, die sofort nach Substratzugabe einsetzte, wie der größere Anstieg der Regressionsgeraden der Reaktionen mit Substrat im Vergleich zur Proteasomenkontrolle im linearen Abschnitt des Zeitverlaufes verdeutlicht (Abb. 28B). Während das reine 26S Proteasom 5nmol Suc-LLVY-AMC/(min*mg Proteasom) umsetzte, haben die Proteasomkomplexe mit Ub₅-MUC₄ im molaren Verhältnis 1:5 bzw. 1:10 spezifische Aktivitäten von 6,5 bzw. 7nmol/(min*mg). Das Diagramm in Abb. 28C stellt die substratinduzierte Erhöhung der Proteasomaktivität in Prozent dar. Die Abszisse (Erhöhung = 0%) entspricht damit der Grundaktivität.

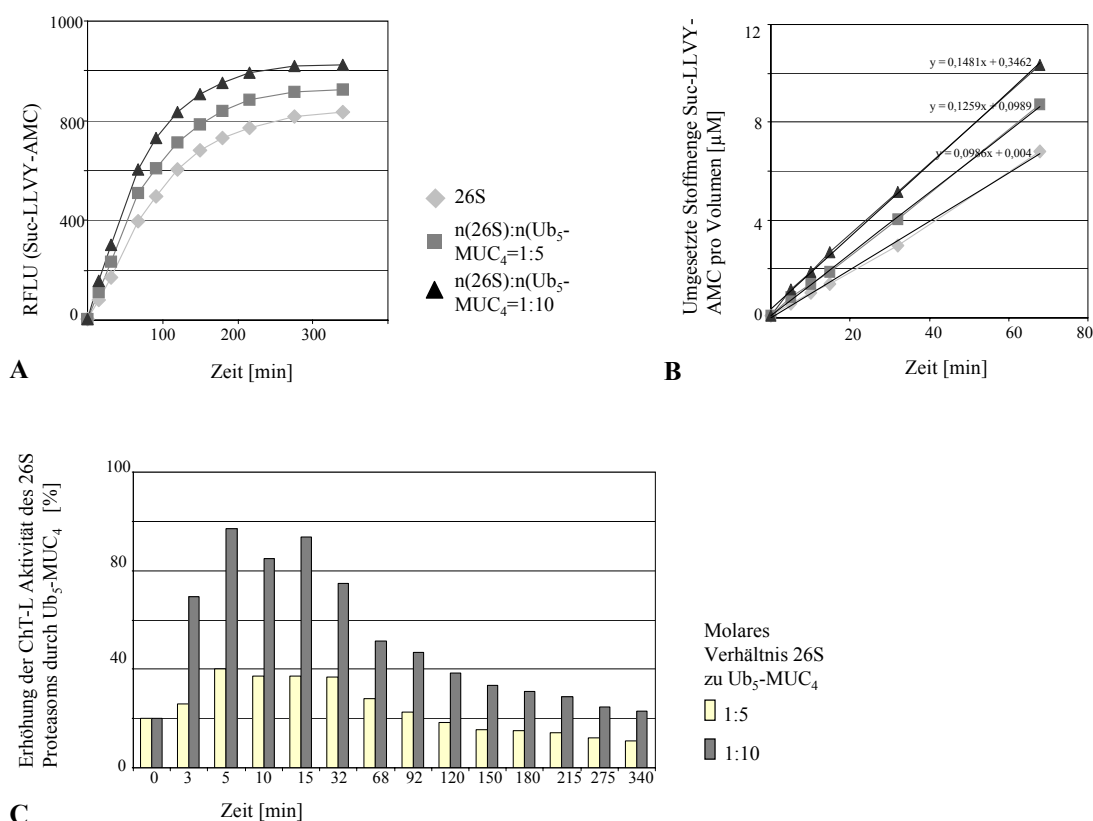


Abb. 28: Kinetische Analyse des stimulierenden Effektes von Ub₅-MUC₄ auf die ChT-L Aktivität des 26S Proteasoms. (A bis C) 26S Proteasomen (30nM) wurden in einem Tris-gepufferten und ATP-regenerierenden System ohne Substrat (Karo) bzw. mit dem Substrat Ub₅-MUC₄ in einem molarem Verhältnis von 1:5 (Rechteck) bzw. 1:10 (Dreieck) für 15min bei 37°C inkubiert und Aktivitätstests unterzogen. Innerhalb eines Zeitraums von 6h wurde zu den angegebenen Zeitpunkten die Proteasomaktivität mittels des fluorogenen Peptids Suc-LLVY-AMC (100μM) bestimmt. Das Experiment wurde zweimal wiederholt. Die Abweichungen betrugen weniger als 5%. (A) Das Diagramm zeigt die für die verschiedenen Ansätze ermittelten Proteasomaktivitäten im Zeitverlauf. (B) Auf der Grundlage einer erstellten Eichgeraden zur Abhängigkeit der gemessenen RFLU von der Konzentration an freigesetzten AMC-Molekülen wurde für die mit bzw. ohne Substrat inkubierten 26S Proteasomen bestimmt, zu welchem Zeitpunkt innerhalb des linearen Verlaufs welche Stoffmenge an fluorogenem Peptid umgesetzt worden war. Der Umsatz im Zeitverlauf ist graphisch dargestellt. Mit Hilfe der dazu ermittelten Regressionsgeraden ließ sich die spezifische Aktivität der 26S Proteasomen bestimmen. (C) Die durch Zugabe des Substrates Ub₅-MUC₄ verursachte prozentuale Erhöhung der ChT-L Aktivität pro Zeitpunkt ist in Diagramm C abgebildet. Helle Balken: molares Verhältnis 26S:Substrat=1:5; dunkle Balken: 26S:Substrat=1:10, RFLU: Relative Fluoreszenzeinheiten

Nach 5-15min Inkubation wurde bei einem molaren Verhältnis 26S:Substrat=1:10 die maximale Erhöhung der Proteasomaktivität um etwa 90% erreicht. Daher wurde für die weiteren Untersuchungen zur substratabhängigen Proteasomstimulierung eine Inkubationszeit von 15min gewählt. Die niedrigeren Prozentwerte für die auf 15min folgenden Zeitpunkte geben eine Abnahme der Stimulierbarkeit wieder, die ein deutlicher Hinweis auf eine substratbedingte Proteasombeeinträchtigung ist, welche auf die Stimulierung und möglicherweise den Substratabbau folgt.

3.3.3 Effekt von Substratbindung und Deubiquitinierung auf die substratinduzierte Proteasomstimulierung

Die kinetische Analyse hatte ergeben, dass die substratvermittelte Proteasomstimulierung sofort nach Substratzugabe einsetzte. Demnach war einer der initialen 26S proteasomalen Substrat-Prozessierungsschritte an dem stimulierenden Effekt beteiligt. Zu den ersten Prozessierungsschritten zählen die Ub-vermittelte Substratbindung und die folgende Deubiquitinierung. Die Bedeutung des Ub-Anteils für die Aktivierung hatte sich zum einen bereits in dem Ergebnis gezeigt, dass die Substrate Ub₅-MUC₄, Ub₅G76-E7, aber nicht BSA zur Proteasomstimulierung in der Lage waren (Kapitel 3.3., Abb. 26) und sich zum anderen in dem Befund widerspiegelt, dass der Mucin1-Bereich des Substrates Ub₅-MUC₄ nicht für die 26S Aktivierung ausreichte (Kapitel 3.3.1, Abb. 27). Die Untersuchung der peptidspaltenden Aktivität nach Inkubation des 26S Proteasoms mit den ubiquitinierten Substraten Ub₅-MUC₈ und Ub₅-MUC_{long} (Abb. 29) zeigte auch für diese Proteine einen proteasomstimulierenden Effekt und macht den Einfluss des Ub im Substrat auf die Proteasomaktivität evident.

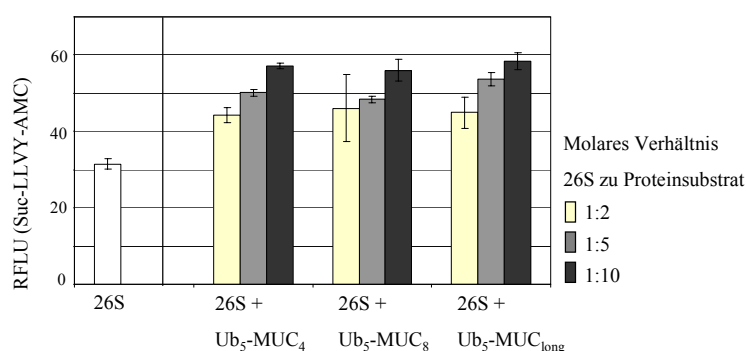


Abb. 29: Analyse des Effektes weiterer ubiquitinierten Substrate auf die ChT-L Aktivität des 26S Proteasoms. 26S Proteasomen (30nM) wurden in einem Tris-gepufferten und ATP-regenerierenden System mit den angegebenen Substraten in molaren Verhältnissen von 1:2 (hell), 1:5 (grau) bzw. 1:10 (schwarz) für 15min bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden einem Aktivitätstest mit 100µM Suc-LLVY-AMC unterzogen. Das Diagramm zeigt die aus drei unabhängigen Experimenten erhaltenen und gemittelten Daten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Thrower *et al.* haben für rekombinante Ub-Konjugate eine Korrelation zwischen der Anzahl der Ub-Moleküle und der Affinität der Konjugate zum 26S Proteasom zeigen können (Thrower *et al.*, 2000). Sollte die in der vorliegenden Arbeit untersuchte substratvermittelte Proteasomstimulierung von der Substratbindung an das Proteasom abhängen, ist zu erwarten, dass ein Substrat mit nur einem statt fünf Ub-Molekülen in deutlich geringerem Maß zur Proteasomstimulierung in der Lage ist. Um diese Annahme zu prüfen, wurde der Einfluss der zu den Substraten Ub₅-MUC₄, Ub₅-MUC₈, und Ub₅G76-E7 korrespondierenden Fusionsproteine (Ub-MUC₄, Ub-MUC₈, und UbG76-E7) auf die proteasomale peptidspaltende Aktivität untersucht. Wie Abb. 30A verdeutlicht, verursachte keines der Fusionsproteine eine Proteasomstimulierung. Die Frage, ob Ub₄ allein bzw. in einem Ansatz mit dem Fusionsprotein zusammen zur Aktivierung führte, wird in Abb. 30B beantwortet. Ub₄ war weder allein noch mit dem Fusionsprotein zur Proteasomstimulierung befähigt. Selbst eine Erhöhung der molaren Menge an Ub₄ auf das 40fache der proteasomalen Menge bewirkte nur eine leichte Aktivitätszunahme,

die allerdings nicht an die durch Ub₅-MUC₄ ausgelöste Stimulierung heranreichte.

Um herauszufinden, ob die Bindung des penta-ubiquitinierten Substrates an das Proteasom zur Aktivierung ausreicht oder ob auch eine Deubiquitinierung erforderlich ist, wurden die DUB-Inhibitoren o-PT und NEM in den von Guterman *et al.* vorgeschlagenen Konzentrationen eingesetzt (Guterman & Glickman, 2004a) (Abb. 30C). Der Zn²⁺-Chelator o-PT führte zu einer deutlichen Reduktion der Stimulierbarkeit, während NEM die Proteasomaktivität generell herabsetzte.

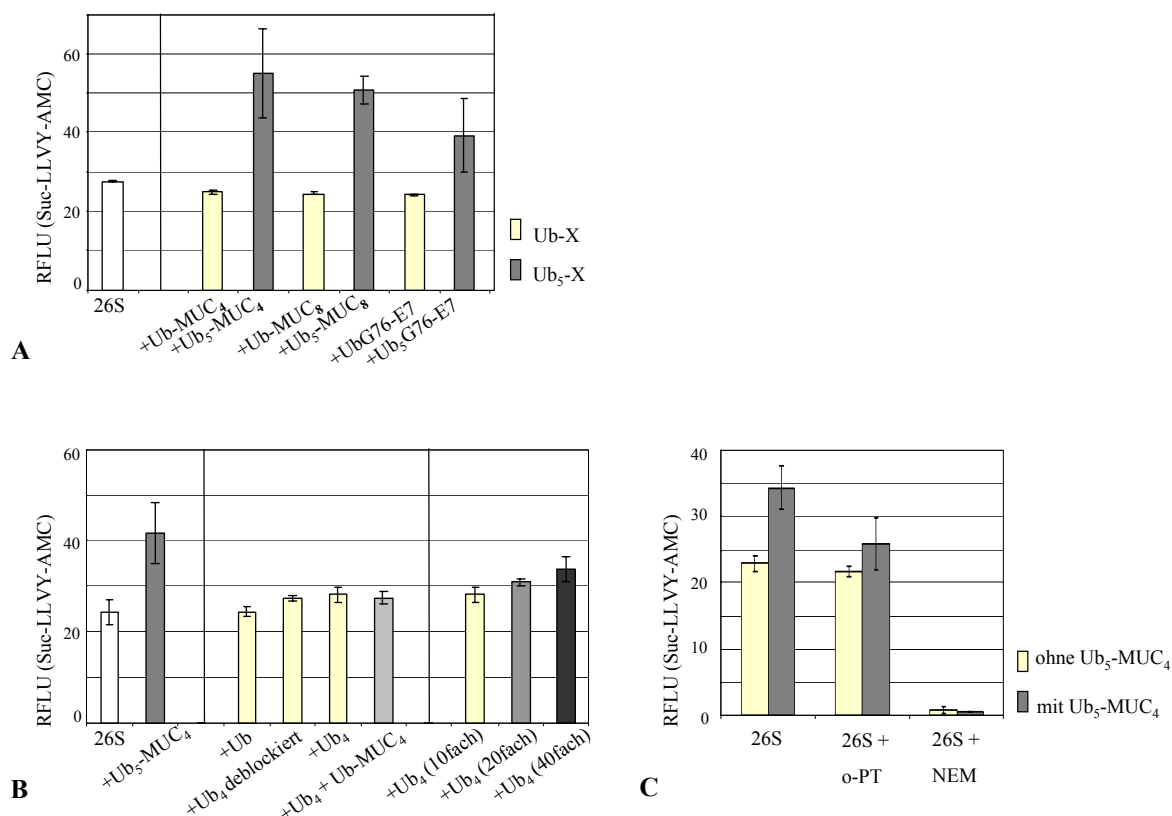


Abb. 30: Einfluss des Ubiquitin-Anteils im Proteinsubstrat auf die substratabhängige Proteasomstimulierung. (A bis C) 26S Proteasomen (30nM) wurden in einem Tris-gepufferten und ATP-regenerierenden System mit den angegebenen Substraten in einem molaren Verhältnis von 1:10 oder wie angegeben für 15min bei 37°C inkubiert und Aktivitätstests mit 100µM Suc-LLVY-AMC unterzogen. Die Diagramme zeigen die aus drei unabhängigen Experimenten erhaltenen und gemittelten Daten. Die Standardabweichungen sind angegeben. (A) Als Substrate wurden die penta-ubiquitinierten Proteine Ub₅-MUC₄, Ub₅-MUC₈, und Ub₅G76-E7 (dunkler Balken) bzw. die entsprechenden Fusionsproteine (heller Balken) eingesetzt. (B) Als Substrate wurden Ub-Spezies verwendet. Tetra-Ubiquitin lag in einer Konzentration von 300nM (=10fach molarer Überschuss) vor oder wie angegeben (20fach molar=600nM bzw. 40fach molar=1,2µM). (C) Die 26S Proteasomen wurden mit dem entsprechenden Inhibitor (5mM o-PT bzw. 5mM NEM) für 15min bei 37°C vorinkubiert. Es folgte eine Inkubation für 15min ohne (helle Balken) bzw. mit 300nM Ub₅-MUC₄ (dunkle Balken).

Die Ergebnisse demonstrieren, dass die Ub-vermittelte Bindung der penta-ubiquitinierten Substrate und auch die Abspaltung der Ub-Markierung am 26 Proteasom Voraussetzungen für die substratinduzierte Proteasomstimulierung sind.

3.3.4 Effekt von ATP-Bindung bzw. Hydrolyse auf die substratvermittelte Proteasomstimulierung

Auf Substratbindung und Deubiquitinierung folgen die als ATP-abhängig geltenden Schritte des *gatings* und der Substratdenaturierung bzw. -translokation (Kohler *et al.*, 2001; Ogura & Tanaka, 2003; Rubin *et al.*, 1998). Da es experimentell schwierig ist, die beiden letztgenannten Stufen separat zu untersuchen, wurde stellvertretend die ATP-Abhängigkeit Gegenstand der Analyse. Um zu prüfen, ob für die substratinduzierte Proteasomstimulierung eine solche Abhängigkeit von ATP besteht, wurden 26S Proteasomen mit ATP-Derivaten inkubiert. Die erste Reaktionsreihe erfolgte ohne zusätzliche ATP-Depletion, die zweite dann mit Apyrase, um das in der Präparation noch vorhandene ATP zu entfernen (Abb. 31).

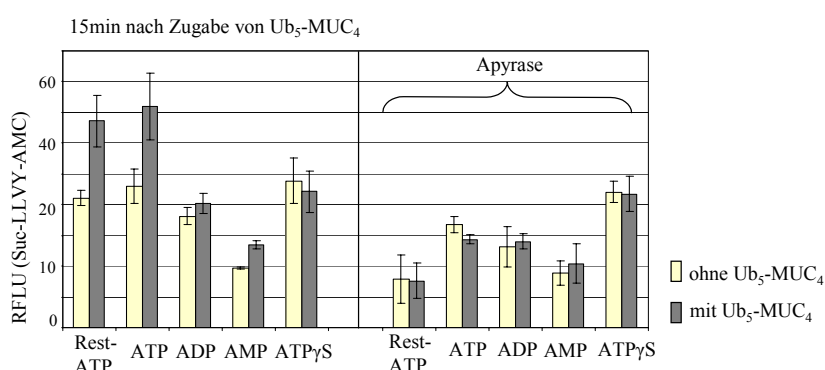


Abb. 31: Untersuchung zur ATP-Abhängigkeit der substratvermittelten Proteasomstimulierung. In Doppelansätzen wurden 26S Proteasomen (30nM) in einem Tris-gepufferten System mit den angegebenen ATP-Derivaten (2mM) für 15min vorinkubiert. Dem Ansatz „Rest-ATP“ wurde kein Nukleotid zugefügt. Das dort befindliche Rest-ATP stammte aus der 26S Präparation. In einer zweiten parallel durchgeführten Reaktionsreihe (rechter Block) wurde in den Doppelansätzen zusätzlich 25U/mL Apyrase eingesetzt. Zu einer Reaktion der Doppelansätze wurde das Substrat Ub₅-MUC₄ (300nM, dunkle Balken) zugesetzt, zu der anderen Reaktion kein Substrat (helle Balken). Alle Reaktionen wurden für weitere 15min bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Aktivitätstest (100μM Suc-LLVY-AMC) analysiert. Das Diagramm zeigt die aus drei unabhängigen Experimenten erhaltenen und gemittelten Daten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Nur in den Reaktionen mit ATP (in Restkonzentration oder frisch dazugesetzt) war eine substratinduzierte Proteasomstimulierung festzustellen (linker Block). ADP und AMP führten dagegen zu einer allgemeinen Aktivitätsverringering. Im Gegensatz dazu war die Proteasomaktivität durch Zugabe des nicht spaltbaren ATP-Analogs ATP_γS generell und substratunabhängig erhöht. Die zusätzliche Behandlung mit Apyrase (rechter Block) sorgte für eine Depletion von ATP und folglich zu einer verringerten proteasomalen Aktivität in den ehemals ATP-haltigen Ansätzen. Allein die Reaktion mit ATP_γS war erwartungsgemäß nicht beeinträchtigt. In keinem der mit Apyrase behandelten Ansätze konnte eine substratinduzierte Proteasomstimulierung nachgewiesen werden, was insgesamt für eine Abhängigkeit der proteasomalen Aktivierung von der ATP-Bindung und Hydrolyse spricht.

3.3.5 Beitrag der drei proteasomalen Hauptaktivitäten an der substratinduzierten Proteasomstimulierung

In den folgenden Experimenten wurde der degradierende Prozessierungsschritt untersucht, um herauszufinden, welchen Anteil die drei verschiedenen proteolytisch aktiven Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ an der substratinduzierten Proteasomstimulierung haben. Dabei stand die Untereinheit $\beta 5$ im Fokus, da sie die als peptido- und proteolytische Hauptaktivität geltende ChT-ähnliche Spezifität vermittelt.

Der Inhibitor clasto-Lactacystin bindet und hemmt spezifisch die Untereinheit $\beta 5$ (Fenteany *et al.*, 1995). Die Verwendung dieses Inhibitors in einer Konzentration von $50\mu\text{M}$ führte in der vorliegenden Arbeit zu einer nahezu vollständigen Hemmung der ChT-L Aktivität des 26S Proteasoms (Abb. 32A), die hauptsächlich von $\beta 5$ ausgeübt wird (Groll *et al.*, 1999; Heinemeyer *et al.*, 1997). Die Trypsin-ähnliche (T-L) Aktivität, die mittels des fluorogenen Substrates Bz-VGR-AMC bestimmbar ist und die größtenteils auf $\beta 2$ zurückgeht, war ebenfalls von clasto-Lactacystin beeinträchtigt (Abb. 32B).

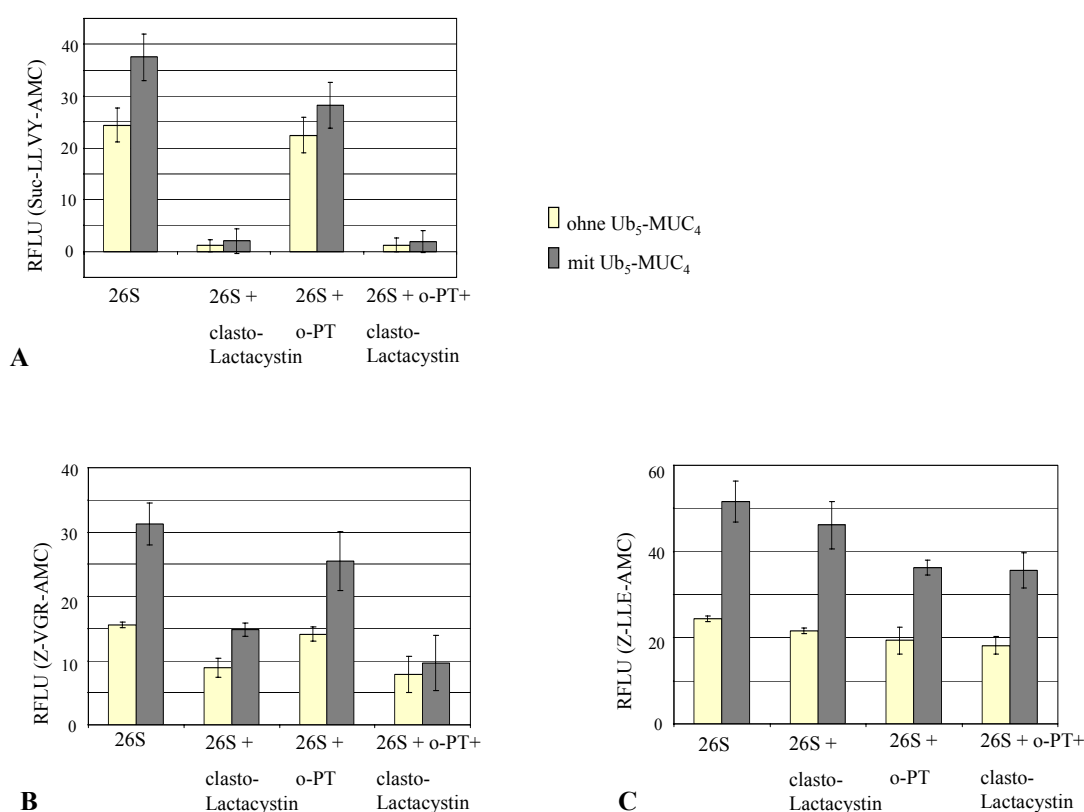


Abb. 32: Beitrag der drei proteasomalen Hauptaktivitäten an der substratvermittelten Stimulierung des 26S Proteasoms. (A bis C) 26S Proteasomen (30nM) wurden in einem Tris-gepufferten und ATP-regenerierenden System mit/ohne die angegebenen Inhibitoren o-PT (5mM) bzw. clasto-Lactacystin ($50\mu\text{M}$) für 15min vorinkubiert. Den Ansätzen wurde kein Substrat (helle Balken) bzw. 300mM Ub₅-MUC₄ (dunkle Balken) zugesetzt. Es folgte eine Inkubation für 15min bei 37°C . Die Proteasomaktivität in den Ansätzen wurde anschließend im Aktivitätstest mit jeweils $100\mu\text{M}$ (A) Suc-LLVY-AMC (ChT-L Aktivität), (B) Bz-VGR-AMC (T-L Aktivität) bzw. (C) Z-LLE-AMC (PGPH Aktivität) geprüft. Es sind die aus drei unabhängigen Experimenten erhaltenen und gemittelten Daten gezeigt. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Die Hemmung kommt dadurch zustande, dass $\beta 5$ auch T-L Aktivität besitzt. Auch die T-L Restaktivität zeigte eine substratabhängige Stimulierbarkeit, die wie im Fall der ChT-L Aktivität einer Verdopplung entsprach. Die PGPH-Aktivität, die weitestgehend von $\beta 1$ ausgeübt wird, war erwartungsgemäß von clasto-Lactacystin nicht beeinflusst und auf das 2,5fache substratinduziert stimulierbar (Abb. 32C). Der Zn^{2+} -Chelator und DUB-Inhibitor o-PT führte – wenn auch in unterschiedlichem Maße – zu einer reduzierten Stimulierbarkeit der drei analysierten Aktivitäten und unterstreicht damit die Bedeutung der Deubiquitinierung für die substratinduzierte Proteasomaktivierung. Den Daten zufolge betrifft die substratvermittelte Stimulierung alle drei proteasomalen Hauptaktivitäten (ChT-L, T-L und PGPH) und beeinträchtigt die Inhibition der von $\beta 5$ vermittelten ChT-L Aktivität die Stimulierbarkeit der anderen Aktivitäten nicht.

Die substratabhängige Proteasomstimulierung erfordert ein funktionelles 26S Proteasom und ist an die Deubiquitinierung und ATP-abhängige Prozessierung eines geeigneten, penta-ubiquitinierten Substrates gekoppelt. Sehr wahrscheinlich vermittelt das Substrat nach Bindung bzw. Prozessierung durch den 19S Regulator eine stabilisierte Öffnung des 20S-gates. Dieser Effekt wird daher im Folgenden als substratinduzierter *gating*-Prozess bezeichnet, der sich in den vorgestellten Experimenten in einem vermehrten Einstrom von fluorogenen Substraten äußerte und daher einen erhöhten Peptidumsatz anzeigte.

3.4 DER EFFEKT VON PA28 AUF DIE PROTEASOMALE PROZESSIERUNG VON Ub_5-MUC_4

Auch vom Proteasom-Aktivator PA28 ist bekannt, dass er die Zugänglichkeit des Substrates zum proteolytischen Bereich des 20S Proteasoms verbessert. Daneben scheint auch eine durch PA28-induzierte erhöhte Affinität der Substrate an den entsprechenden Bindungsstellen im 20S *core*-Partikel für die Proteasomaktivierung mitverantwortlich zu sein. Beide Effekte sind als Folge PA28-induzierter Konformationsänderungen zu interpretieren (Stohwasser *et al.*, 2000; Whitby *et al.*, 2000). *In vivo* und *in vitro* Experimenten mit dem 20S-Komplex zufolge nimmt PA28 auf die Antigenprozessierung Einfluss und führt zu einer veränderten Quantität bestimmter proteasomal generierter Fragmente (Dick *et al.*, 1996; Groettrup *et al.*, 1996; Sijts *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2002).

Tanahashi *et al.* haben mittels Präzipitationsexperimenten die Existenz sogenannter Hybridproteasomen zeigen können (Tanahashi *et al.*, 2000). Dies sind Proteasomen, die sowohl einen 19S Regulator als auch einen PA28-Komplex gebunden haben und damit zur Prozessierung ubiquitinierten Substrate in der Lage sein sollten. Kopp *et al.* untersuchten die peptidsplattende Aktivität rekonstituierter Hybridproteasomen und konnten für diese eine peptidsplattende Proteasomaktivität ermitteln, die der von 26S-Komplexen mit zwei 19S Regulatoren (RP_2CP) entsprach (Kopp *et al.*, 2001).

Untersuchungen zum Einfluss von PA28 auf das 26S Proteasom haben sich bisher weitestgehend auf die Analyse der peptidsplattenden Aktivität beschränkt. Im Folgenden sollte die proteolytische Aktivität des 26S Proteasoms unter der Fragestellung untersucht werden, ob und inwiefern sich die Präsenz von PA28 auf die proteasomale Prozessierung des Proteinsubstrates Ub_5-MUC_4 auswirkt.

Dazu wurde zunächst mittels fluorogener Peptide geprüft, welchen Effekt PA28 auf die peptid-spaltende Aktivität des 26S Proteasoms (RP_1CP) ausübt, also welche proteasomalen Subkomplexe mit PA28 interagieren und auf diese Weise aktiviert werden. 26S Proteasomen wurden mit aus Erythrozyten isoliertem PA28-Komplex in einem molaren Verhältnis von 1:3 vorinkubiert und die Suc-LLVY-AMC spaltende Aktivität analysiert. Im Aktivitätstest zeigte sich, dass der PA28-Komplex nur zu einer Proteasomstimulierung um 25% führte, während im Kontrollansatz die co-Inkubation von PA28 mit dem 20S Proteasom eine Verzehnfachung der Aktivität zur Folge hatte (Abb. 33A).

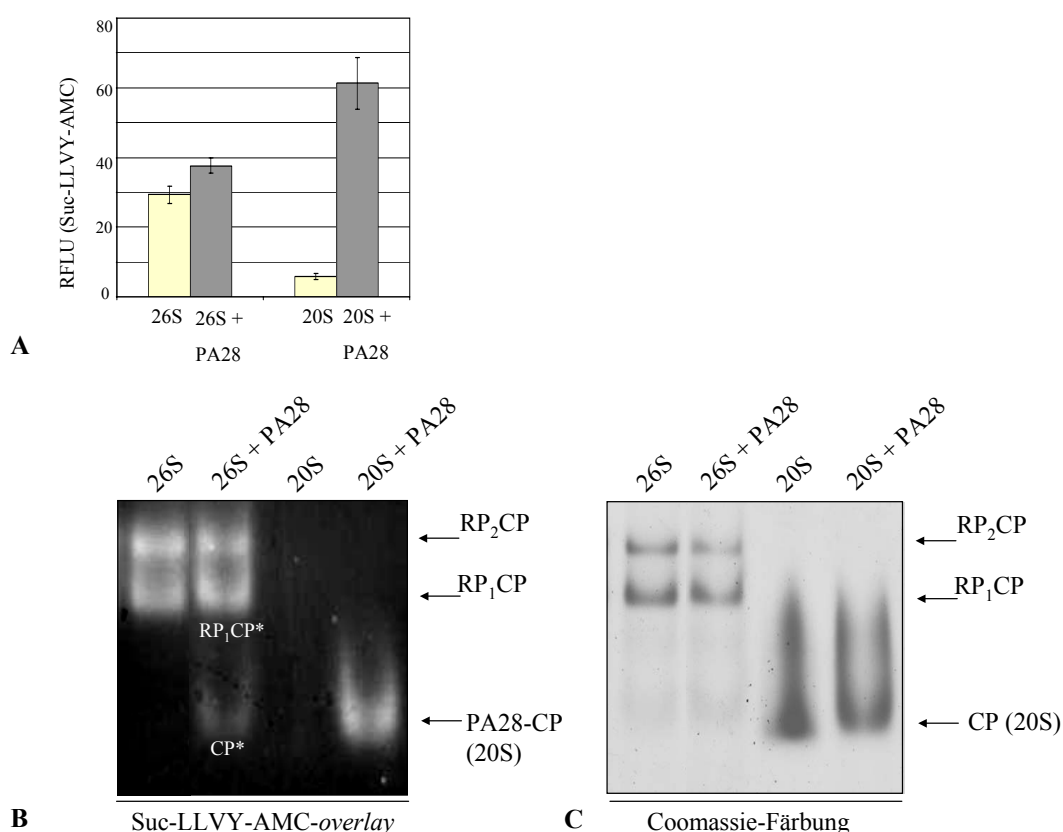


Abb. 33: Einfluss von PA28 auf die ChT-L Aktivität des 26S und 20S Proteasoms. 26S sowie 20S Proteasomen (30nM) wurden in einem Tris-gepufferten und nur im Fall der 26S Proteasomen ATP-regenerierenden System mit/ohne aus Erythrozyten isoliertem PA28 (90mM) für 15min bei 37°C inkubiert. **(A)** Die ChT-L Aktivität der so behandelten Proteasomen wurde in einem Aktivitätstest mit 100µM Suc-LLVY-AMC ermittelt. **(B)** Die Inkubationsansätze wurden einer Nativ-PAGE sowie einem fluorogenen Peptid-overlay mit 100µM Suc-LLVY-AMC unterzogen. **(C)** Das Gel wurde abschließend Coomassie-gefärbt. RP_2CP : 26S mit 2x19S, RP_1CP : 26S mit 1x19S, RP_1CP^* : durch PA28 aktivierter Komplex, CP: 20S core-Partikel, CP^* durch PA28 aktivierter CP

Wie aus der Nativ-PAGE hervorgeht, beruhte die Aktivitätssteigerung der 26S Präparation weitestgehend auf der Bindung und Stimulierung der wenigen in der Präparation vorliegenden 20S Proteasomen (Abb. 33B, CP^*). An Position des RP_1CP -Komplexes war eine leichte Aktivitätserhöhung erkennbar (Abb. 33B, RP_1CP^*), die – der in Abb. 33C gezeigten Coomassie-Färbung zufolge – nicht auf einer erhöhten Menge an RP_1CP -Komplexen basierte, sondern auf die Bildung von wenigen Hybridproteasomen hindeutet.

Die folgende massenspektrometrische Analyse der Prozessierungsexperimente mit dem 26S-Komplex mit/ohne PA28 unter Nutzung des Substrates Ub₅-MUC₄ demonstrierte, dass in dem Ansatz mit dem Aktivator bestimmte Fragmente in größerer Menge gebildet wurden, aber auch neue Produkte entstanden. Die Schnitkarte in Abb. 34 gibt Fragmente, deren Quantität in beiden Reaktionen gleich blieb, als schwarze Balken wieder. Produkte, die mit PA28 verstärkt vorlagen, erscheinen in blau und nur im Ansatz mit PA28 detektierbare Fragmente rot.

Wie die Schnitkarte zeigt, wurden mit dem Aktivator PA28 durch das Proteasom Fragmente insbesondere aus dem hydrophoben Mucin1-Anteil neu bzw. in höherer Quantität generiert. Dabei waren das Epitop und das nur mit PA28 entstandene Doppelepitop in großer Menge nachzuweisen. Zusätzlich konnten mit PA28 zwei große Fragmente von 28 bzw. 31 AA Länge detektiert werden, die NH₂-terminal den DUB-typischen Schnitt nach dem Doppel-Glycin aufweisen und sich sehr wahrscheinlich von dem durch Deubiquitinierung gebildeten GS-Vierfachepitop ableiten. Daneben war im Ansatz mit PA28 ein Ub-MUC-Übergangsfragment zu finden, welches die proteasomale Prozessierbarkeit von Ub bestätigt.

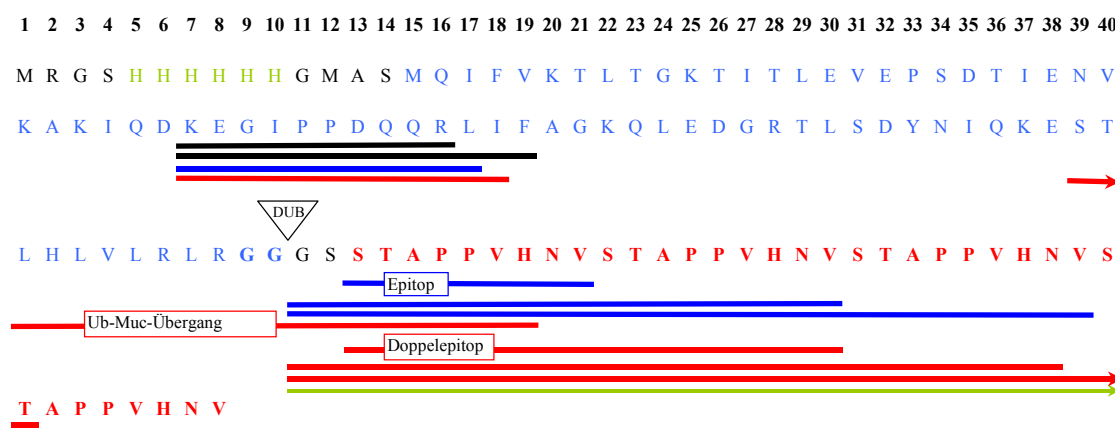


Abb. 34: Schnittkarte zum Substrat Ub₅-MUC₄ nach 26S proteasomaler Prozessierung mit PA28. Es sind die dominanten Fragmente dargestellt, die zum Zeitpunkt 15min nach *in vitro* Degradation von Ub₅-MUC₄ durch das 26 Proteasom (30nM) ohne bzw. mit PA28 (90nM) entstanden sind und per MALDI-MS und HPLC-MALDI-MS identifiziert wurden. Die Farbe der Buchstaben, die die Aminosäuresequenz des Fusionsproteins Ub-MUC₄ repräsentieren, zeigt die Zugehörigkeit zur His₆-Markierung (grün), zum Ub-Anteil (blau), zum Mucin-Anteil (rot). Die Querbalken geben die massenspektrometrisch ermittelten Degradationsfragmente wieder. Dabei entsprechen die schwarzen Balken Fragmenten, deren Quantität sich mit Zugabe von PA28 nicht verändert hat und die blauen Balken Produkten, die mit PA28 in größerer Menge generiert wurden. Die roten Balken geben Fragmente an, die nur in den Degradationsansätzen mit PA28 detektiert wurden. Das Dreieck kennzeichnet den DUB-typischen Schnitt nach G75G76 im Ub-Anteil. Der grüne Balken entspricht dem durch DUBs entstandenen GS-MUC₄-Produkt. Die Pfeile weisen auf die Fortführung der Balken in der nächsten Zeile hin.

Die Untersuchung der zu den Prozessierungsexperimenten ermittelten P1-Positionen ist in Tab. 7 zusammengefasst. Der Vergleich der ohne PA28 proteasomal generierten Produkte mit denen ausschließlich bzw. verstärkt mit PA28 gewonnenen Fragmenten hinsichtlich der in den P1-Positionen auftretenden Aminosäuren zeigt, dass PA28 zu einer Verschiebung in Richtung polarer bis hydrophober Aminosäuren an P1-Position (60%→71%) führte.

Tab. 7: Vergleich der zu den Abbauxperimenten mit dem Substrat Ub₅-MUC₄ und ohne/mit PA28 massenspektrometrisch erhaltenen Daten hinsichtlich der P1-Positionen. Die P1-Positionen sind anhand der verschiedenen identifizierten dominanten Produkte ermittelt worden, die in den Prozessierungsexperimenten mit dem Substrat Ub₅-MUC₄ durch das 26S Proteasom ohne bzw. mit PA28 entstanden. Die durch DUBs ausgeführte Spaltung nach G75G76 wurde nicht berücksichtigt. Es ist die Häufigkeit der an den P1-Positionen befindlichen Aminosäuren angegeben, die den entsprechenden proteasomalen Spaltpräferenzen zugeordnet wurden. Schnitte nach den AA Ser, Thr und Met sind für das Enzym Elastase typisch und wurden daher der Spaltpräferenz Elastase-ähnlich (Elastase-L) zugeordnet. AA: Aminosäuren, P1: P1-Position, BrAAP: Spaltpräferenz nach verzweigtkettigen Aminosäuren und SNAAP: Spaltpräferenz nach kleinen, neutralen Aminosäuren (Orlowski *et al.*, 1993), ChT-L: Chymotrypsin-ähnlich, Caspase-L: Caspase-ähnlich, PGPH: Peptidylglutamyl-Peptidhydrolase, T-L: Trypsin-ähnlich

| Substrat | Ub ₅ -MUC ₄ | Ub ₅ -MUC ₄ | Ub ₅ -MUC ₄ |
|---|--|--|---|
| PA28 | – | + | + |
| Auswahl an berücksichtigten dominanten Produkten | alle ohne PA28 nachweisbaren dominanten Produkte | mit PA28 verstärkt oder neu auftretende Produkte | alle mit PA28 nachweisbaren dominanten Produkte |
| Anzahl an hydrophoben bis polaren AA in P1: ChT-L/BrAAP: Leu, Phe, Ile, Val, Asn SNAAP: Gly, Ala Elastase-L: Ser, Thr, Met | 5 0 1 | 7 0 3 | 8 0 3 |
| Gesamtanzahl hydrophob-polarer AA in P1: Anteil hydrophob-polarer P1 an Gesamt P1: | 6 60% | 10 71% | 11 61% |
| Anzahl an geladenen AA in P1: Caspase-L: Asp PGPH: Glu Trypsin-L: Arg, Lys, His | 3 0 1 | 2 1 1 | 4 1 2 |
| Gesamtanzahl geladener AA in P1: Anteil geladener AA in P1 an Gesamt P1: | 4 40% | 4 29% | 7 39% |

Es ist vorstellbar, dass PA28 – als Bestandteil des Hybridproteasoms oder assoziiert an den 20S-Komplex – die Präferenz für Schnitte nach aliphatischen Resten verstärkt, die sich in der hohen Quantität an Fragmenten aus dem hydrophoben Mucin1-Bereich widerspiegelt. Eine genauere Analyse des Einflusses von PA28 auf die Länge der generierten Fragmente machte deutlich, dass die nur im Ansatz mit PA28 nachgewiesenen Produkte u.a. von 28 und 31 AA Länge relativ groß sind. Diese weisen einen durch DUBs prozessierten NH₂-Terminus auf, besitzen also den gleichen Aminoterminus wie das in allen Ansätzen durch Deubiquitinierung freigesetzte Produkt GS-MUC₄.

Die präsentierten Daten dokumentieren einen deutlichen Effekt des Aktivators PA28 auf die proteasomale Prozessierung des Proteinsubstrates Ub₅-MUC₄. Es war hauptsächlich eine durch PA28 verstärkte Generierung von Fragmenten aus dem Mucin1-Bereich festzustellen, die zum einen zu einer erhöhten Quantität bereits ohne Aktivator detektierter Produkte und zum anderen zur Entstehung neuer und tendenziell längerer Fragmente führte. Welcher Komplexotyp letztlich zu dem veränderten Produktspektrum beitrug, konnte nicht eindeutig ermittelt werden. Allerdings scheint wahrscheinlich, dass das Ub-MUC1-Übergangsfragment – als Vertreter der längeren Fragmente – das Produkt eines 19S-20S-PA28 Hybridkomplexes ist, weil nur dieser das Potential zur Ubiquitin entfaltung sowie zur PA28-modulierten Fragmentgenerierung besitzt.

3.5 DIE ROLLE DER UNTEREINHEIT BETA5 BEI DER PROTEASOMALEN PROZESSIERUNG UBIQUITINIERTER MUC1-DERIVATE

Die in Kapitel 3.3.5 vorgestellten Ergebnisse hatten u.a. gezeigt, dass die substratinduzierte Proteasomstimulierung bei allen der drei analysierten Hauptaktivitäten zu beobachten war. Das Ausschalten der Untereinheit $\beta 5$, das unter Verwendung von clasto-Lactacystin möglich wurde und eine komplette Inhibition der ChT-L Aktivität zur Folge hatte, beeinträchtigte die Stimulierbarkeit der T-L- und der PGPH-Aktivität nicht.

Im Fall der proteasomalen Prozessierung von Peptid- und Proteinsubstraten wurde dagegen bis vor kurzem für die Untereinheit $\beta 5$ eine essentielle Rolle angenommen. Kisselev *et al.* postulierten 1999 – aufgrund von Abbaudaten zu den Substraten FITC-Lactalbumin und FITC-Casein – das Prozessierungsmodell des *bite and chew* (Kisselev *et al.*, 1999a). Danach erfolgt der initiale Schnitt im Substrat generell durch die Untereinheit $\beta 5$ (*bite*) und die folgende Prozessierung über die dadurch aktivierten Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 2$ (*chew*). Weitestgehend Konsens bestand in der Annahme, dass die durch $\beta 5$ vermittelte Aktivität die Degradationsgeschwindigkeit bestimmt und damit essentiell ist. Chen *et al.* und Jager *et al.* hatten demgegenüber im Hefesystem zeigen können, dass $\beta 5$ T1A-Mutanten zwar letal sind, dieser Effekt aber primär auf einer gestörten Proteasomassemblierung basiert und nicht auf der essentiellen Bedeutung der $\beta 5$ -vermittelten ChT-L Aktivität (Chen & Hochstrasser, 1996; Jager *et al.*, 1999).

Mit den in der vorliegenden Arbeit generierten funktionellen Modells substraten Ub₅-MUC₄, Ub₅-MUC₈, und Ub₅-MUC_{long} sollte im Folgenden die Rolle der proteolytisch aktiven Untereinheit $\beta 5$ bei der Prozessierung der genannten Proteinsubstrate durch das 26S Proteasom untersucht werden. Dazu wurden parallel zu unbehandelten Kontrollansätzen 26S Proteasomen mit clasto-Lactacystin vorinkubiert. Clasto-Lactacystin bindet und hemmt spezifisch das Thr10 der Untereinheit $\beta 5$ (Fenteany *et al.*, 1995). Die verwendete Konzentration von 50 μ M hatte nachweislich zu einer vollständigen Inhibition der mittels Suc-LLVY-AMC bestimmbaren ChT-L Aktivität geführt (Kapitel 3.3.5, Abb. 32). Die massenspektrometrische Analyse des Prozessierungsexperimentes mit dem Substrat Ub₅-MUC₄ zeigte für den clasto-Lactacystin behandelten Ansatz (Abb. 35B) ein größeres Spektrum an dominanten Fragmenten als in der inhibitorfreien Kontrolle (Abb. 35A). Dabei waren sowohl im Ub-Anteil als auch im MUC1-Bereich mehr Produkte zu detektieren, die durch Schnitte nach tendenziell sauren (z.B. D46, E78) bzw. basischen AA (R88) entstanden. Diese „zusätzlich“ auftretenden Produkte waren zum Teil auch im Ansatz ohne Inhibitor zu finden, aber dort nur in sehr geringer Menge nachzuweisen. Sie sind in der Schnitkarte gestrichelt dargestellt. Die bereits ohne clasto-Lactacystin gut nachweisbaren Fragmente, wie z.B. das MUC1-Epitop p950-958, wurden mit Inhibitor in einer deutlich größeren Quantität generiert. Dabei korrelierte die Zunahme an Produkten mit einer verstärkten Substratabnahme. Im Ansatz mit clasto-Lactacystin war außerdem ein Ub-MUC1-Übergangsfragment nachweisbar, was die Möglichkeit aufzeigt, dass Ubiquitin als an den MUC1-Bereich fusionierter Bestandteil des Substrates in das Proteasom eingefädelt und prozessiert wird.

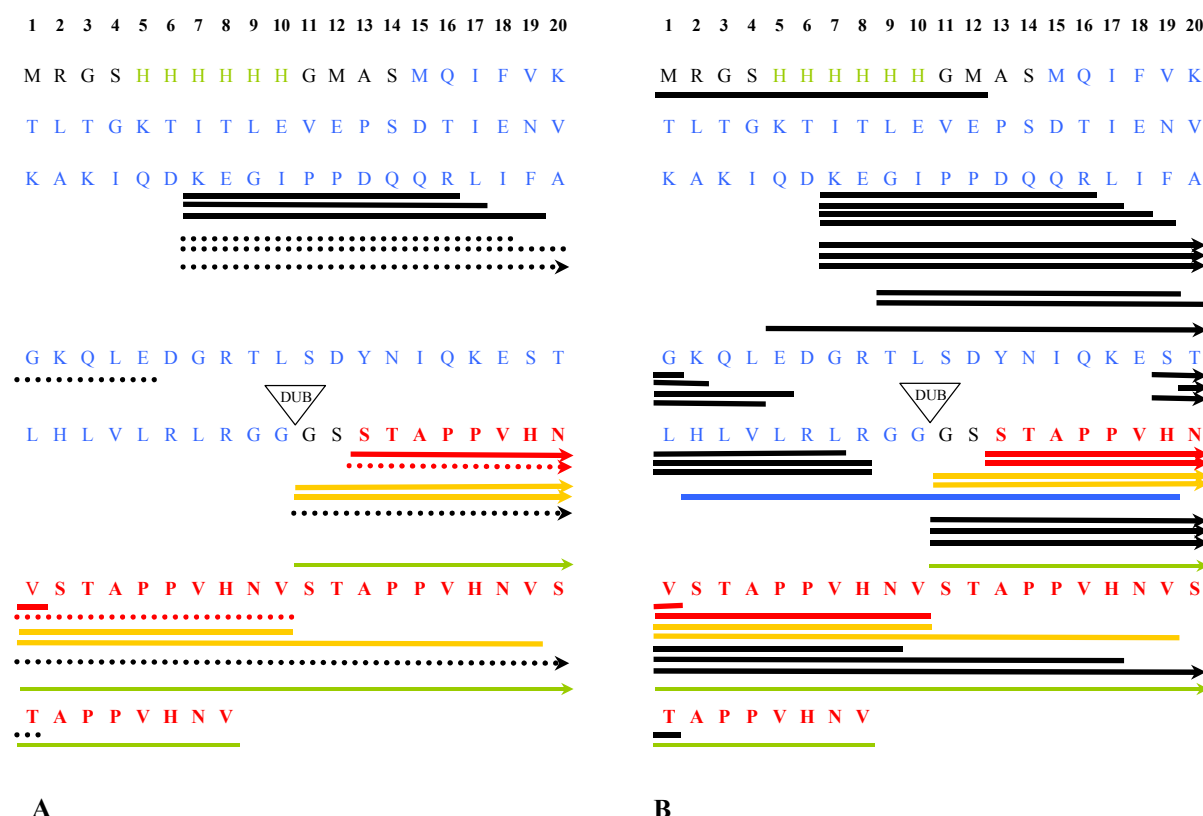


Abb. 35: Schnittkarte zum Substrat Ub₅-MUC₄ nach 26S proteasomaler Prozessierung mit clasto-Lactacystin. Als durchgängige Querbalken sind die dominanten Fragmente dargestellt, die zum Zeitpunkt 15min nach *in vitro* Degradation von Ub₅-MUC₄ durch das 26 Proteasom **(A)** ohne bzw. **(B)** mit clasto-Lactacystin (50μM, 15min Vorinkubation) entstanden sind und per MALDI-MS und HPLC-MALDI-MS identifiziert wurden. Die Farbe der in der Schnittkarte aufgeführten Buchstaben, die die Aminosäuresequenz des Fusionsproteins Ub-MUC₄ repräsentieren, zeigt die Zugehörigkeit zur His₆-Markierung (grün), zum Ub-Anteil (blau), zum Mucin1-Anteil (rot). Die gestrichelten Querbalken geben Fragmente wieder, die in sehr geringer Konzentration auftraten. Die roten Balken entsprechen dem Epitop bzw. Doppelepitop, die gelben Balken Epitop-Vorläufern, der blaue Balken einem Ub-MUC1-Übergangsfragment, der grüne Balken dem durch Deubiquitinierung entstandenen GS-MUC₄-Produkt. Das Dreieck zeigt den DUB-typischen Schnitt nach G75G76 im Ub-Anteil. Die Pfeile weisen auf die Fortführung der Balken in der nächsten Zeile hin.

Ein ähnliches Bild ergab die Analyse der Schnittkarte zur Prozessierung des Substrates Ub₅-MUC_{long} (Abb. 36). Auch hier zeigte sich im Ansatz mit clasto-Lactacystin im Ub-Abschnitt und im MUC1-Bereich eine größere Zahl an Fragmenten, die auf einer allgemein erhöhten Produktquantität beruhte. Neu waren dominante Schnitte wiederum nach AA mit polaren Seitenresten, wie z.B. D46 und E78.

Die tabellarische Zusammenfassung der Prozessierungsexperimente mit den ubiquitinierten Mucin1-Derivaten zeigt insbesondere für die Ansätze mit den Substraten Ub₅-MUC₄ und Ub₅-MUC_{long} einen durch clasto-Lactacystin deutlich gesteigerten Substratumsatz (Tab. 8). Dieser ging einher mit einer allgemein erhöhten Quantität an generierten Produkten. Dies gilt sowohl für MUC1-abgeleitete Fragmente (u.a. Epitop, Doppel- bzw. Dreifachepitop) als auch für solche, die aus dem Ub-Anteil entstanden.

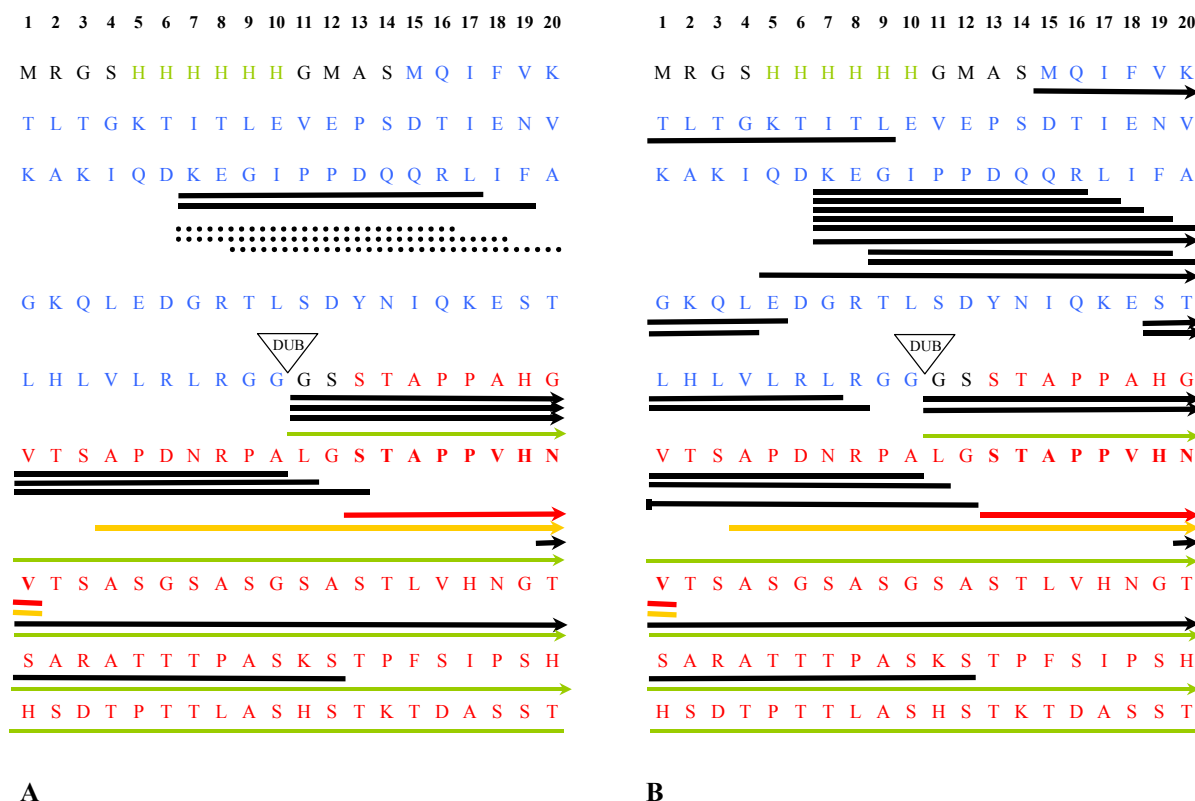


Abb. 36: Schnitkarte zum Substrat Ub₅-MUC_{long} nach 26S proteasomaler Prozessierung mit clasto-Lactacystin. Als durchgängige Querbalken sind die dominanten Fragmente dargestellt, die zum Zeitpunkt 15min nach *in vitro* Degradation von Ub₅-MUC_{long} durch das 26 Proteasom **(A)** ohne bzw. **(B)** mit clasto-Lactacystin (50μM, 15min Vorinkubation) entstanden sind und per MALDI-MS ermittelt und mittels einer substratspezifischen GPMW32-Datenbank bestätigt wurden. Die Farbe der in der Schnitkarte aufgeführten Buchstaben, die die Aminosäuresequenz des Fusionsproteins Ub-MUC_{long} repräsentieren, zeigt die Zugehörigkeit zur His₆-Markierung (grün), zum Ub-Anteil (blau), zum Mucin-Anteil (rot). Die gestrichelten Querbalken geben Fragmente wieder, die in sehr geringer Konzentration auftraten. Der rote Balken entspricht dem Epitop, der gelbe Balken einem Epitop-Vorläufer, der grüne Balken dem durch Deubiquitinierung entstandenen GS-MUC_{long}-Produkt. Das Dreieck zeigt den DUB-typischen Schnitt nach G75G76 im Ub-Anteil. Die Pfeile weisen auf die Fortführung der Balken in der nächsten Zeile hin.

Tab. 8: Vergleich der massenspektrometrisch ermittelten Daten zu den Abbauxperimenten mit den MUC1-Derivaten und clasto-Lactacystin. Die Tabelle gibt einen Überblick über den Umfang von Substratumsatz und generierten Produkten, die bei der Prozessierung der Substrate Ub₅-MUC₄, Ub₅-MUC₈ und Ub₅-MUC_{long} durch das 26S Proteasom ohne bzw. mit clasto-Lactacystin (50μM, 15min Vorinkubation) entstanden sind. Die Höhe an Substratabnahme und Produktquantität wird durch folgende Symbolik wiedergegeben: +: schwach, ++: mittel, +++: stark, -: Produkt nicht möglich. GS-MUC_x: durch DUBs entstandene Produkte GS-MUC_{4/8/long}

| Eingesetztes Substrat | Ub ₅ -MUC ₄ | | Ub ₅ -MUC ₈ | | Ub ₅ -MUC _{long} | |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----|-----------------------------------|----|--------------------------------------|-----|
| clasto-Lactacystin | – | + | – | + | – | + |
| Substratabnahme | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ |
| Freisetzung von: | | | | | | |
| Ub ₅ | +++ | ++ | + | + | ++ | ++ |
| GS-MUC _x | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ |
| Generierung von: | | | | | | |
| Epitop | ++ | +++ | ++ | ++ | + | ++ |
| Zweifachepitop/GS-Zweifachepitop | + | ++ | ++ | ++ | – | – |
| Dreifachepitop/GS-Dreifachepitop | + | + | + | ++ | – | – |
| Allgemeine Produktquantität | + | +++ | + | ++ | + | ++ |

Tab. 9 gibt Auskunft über die Art der Aminosäuren in den zu den o.g. Prozessierungsexperimenten ermittelten P1-Positionen. Die Daten bestätigen, dass die Inkubation des 26S Proteasoms mit dem Inhibitor clasto-Lactacystin eine Zunahme an neuen proteasomalen Schnitten nach geladenen AA zur Folge hatte. Dies gilt auch für die Gruppe der hydrophoben bis polaren AA, aber dort in geringerem Umfang. Damit ergibt sich im Fall der Substrate Ub₅-MUC₄ und Ub₅-MUC_{long} eine durch clasto-Lactacystin induzierte Verschiebung der proteasomalen Schnittpräferenz in Richtung AA mit sauren bzw. basischen Resten.

Tab. 9: Vergleich der zu den Abbauxperimenten mit den MUC1-Derivaten und clasto-Lactacystin massenspektrometrisch erhaltenen Daten hinsichtlich der P1-Positionen. Die P1-Positionen sind anhand der verschiedenen identifizierten dominanten Produkte ermittelt worden, die in den Prozessierungsexperimenten mit den Substraten Ub₅-MUC₄, Ub₅-MUC₈ und Ub₅-MUC_{long} durch das 26S Proteasom ohne bzw. mit clasto-Lactacystin (50µM, 15min Vorinkubation) entstanden sind. Die durch DUBs ausgeführte Spaltung nach G75G76 wurde nicht berücksichtigt. Es ist die Häufigkeit der an den P1-Positionen befindlichen Aminosäuren angegeben, die den entsprechenden proteasomalen Spaltpräferenzen zugeordnet wurden. Schnitte nach den AA Ser, Thr und Met sind für das Enzym Elastase typisch und wurden daher der Spaltpräferenz Elastase-ähnlich (Elastase-L) zugeordnet. AA: Aminosäuren, P1: P1-Position, BrAAP: Spaltpräferenz nach verzweigtkettigen Aminosäuren und SNAAP: Spaltpräferenz nach kleinen, neutralen Aminosäuren (Orlowski *et al.*, 1993), ChT-L: Chymotrypsin-ähnlich, Caspase-L: Caspase-ähnlich, PGPH: Peptidylglutamyl-Peptidhydrolase, T-L: Trypsin-ähnlich

| Substrat | Ub ₅ -MUC ₄ | Ub ₅ -MUC ₄ | Ub ₅ -MUC ₈ | Ub ₅ -MUC ₈ | Ub ₅ -MUC _{long} | Ub ₅ -MUC _{long} |
|--|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| clasto-Lactacystin | – | + | – | + | – | + |
| Anzahl an hydrophob bis polaren AA in P1: | | | | | | |
| ChT-L/BrAAP: Leu, Phe, Ile, Val, Asn | 5 | 13 | 5 | 6 | 5 | 11 |
| SNAAP: Gly, Ala | 0 | 2 | 1 | 1 | 2 | 6 |
| Elastase-L: Ser, Thr, Met | 1 | 5 | 2 | 5 | 3 | 3 |
| Gesamtanzahl hydrophob-polarer AA in P1: | 6 | 20 | 8 | 12 | 10 | 20 |
| Anteil hydrophob-polarer AA in P1 an Gesamt P1: | 60% | 53% | 57% | 57% | 77% | 59% |
| Anzahl an geladenen AA in P1: | | | | | | |
| Caspase-L: Asp | 3 | 7 | 5 | 5 | 2 | 6 |
| PGPH: Glu | 0 | 5 | 0 | 2 | 0 | 5 |
| Trypsin-L: Arg, Lys, His | 1 | 6 | 1 | 2 | 1 | 3 |
| Gesamtanzahl geladener AA in P1: | 4 | 18 | 6 | 9 | 3 | 14 |
| Anteil geladener AA in P1 an Gesamt-P1: | 40% | 47% | 43% | 43% | 23% | 41% |

Im Ansatz mit Ub₅-MUC₄ entfielen ohne Inhibitor 40% und mit Inhibitor 47% der P1-Positionen auf geladene AA, im Ansatz mit Ub₅-MUC_{long} waren es ohne clasto-Lactacystin 23% und mit Inhibitor 41%. In der Reaktion mit Ub₅-MUC₈ hatten sich hinsichtlich der Hydrophobizität der mit bzw. ohne Inhibitor ermittelten Aminosäuren an den P1-Positionen keine Veränderungen ergeben. Die aber in allen Fällen erhöhte Quantität der durch Spaltungen nach geladenen Aminosäuren entstandenen Fragmente lässt eine deutliche Tendenz in Richtung geladener P1-Positionen erkennen. Dies ist nachvollziehbar, da mit clasto-Lactacystin eine vollständige Blockierung der β5-vermittelten ChT-L Aktivität erfolgte und sich dadurch wahrscheinlich der Substratzugang zu den nicht beeinträchtigten Untereinheiten β1 und β2 verbesserte. Auch die generelle ChT-L Aktivität nach Proteasombehandlung mit clasto-Lactacystin war erhöht, wie die absolute Zunahme hydrophober Aminosäuren in den P1-

Positionen beweist. Offensichtlich sind auch $\beta 1$ und $\beta 2$ in der Lage, Proteinsubstrate ChT-ähnlich zu spalten. Die Analyse des Einflusses von clasto-Lactacystin auf die Länge der proteasomal generierten Fragmente ergab keine signifikante Änderung in der Längenverteilung. Die Zunahme der Produktquantität betraf kurze und lange Fragmente in gleichem Maße.

Die Experimente zur Inhibition der proteasomalen Untereinheit $\beta 5$ mit clasto-Lactacystin zeigen, dass $\beta 5$ für den Proteinabbau nicht essentiell ist. Die nicht durch den Inhibitor blockierten Untereinheiten $\beta 1$ bzw. $\beta 2$ verfügen – wie $\beta 5$ – über eine ChT-L Aktivität, die sich in der Prozessierung der penta-ubiquitinierten Substrate Ub₅-MUC₄, Ub₅-MUC₈ und Ub₅-MUC_{long} präsentierte. Obwohl die Aktivitätsanalyse mittels fluorogener Peptidsubstrate eine vollständige durch clasto-Lactacystin verursachte Hemmung der ChT-L Aktivität ergeben hatte, war im Proteinabbau-Experiment keine signifikante Beeinträchtigung der ChT-L Aktivität festzustellen. Dieser Befund bekräftigt, dass die anhand von Peptidsubstraten gewonnenen Daten nicht unreflektiert auf das ubiquitin- und ATP-abhängige proteinspaltende System übertragen werden können.

3.6 DER EINFLUSS DES SUBSTRATUMSATZES AUF DIE PROTEASOMSTABILITÄT

Bei der Untersuchung der substratinduzierten Stimulierung der 26S proteasomalen peptidspaltenden Aktivität (Kapitel 3.3) hatte sich herausgestellt, dass die verwendeten penta-ubiquitinierten Mucin1-Derivate im Zuge der proteasomalen Substratprozessierung zu einem *gating*-Effekt führen. Die Nativ-gelelektrophoretische Analyse des 26S Proteasoms während bzw. nach Substratumsatz hatte dies für die beiden Proteasomkomplexe RP₂CP und RP₁CP (Kapitel 3.3, Abb. 26A und B) bestätigt. Allerdings deutete sich an, dass die Erhöhung der Proteasomaktivität von RP₁CP mit der Zunahme der Menge dieses Komplexes verbunden war.

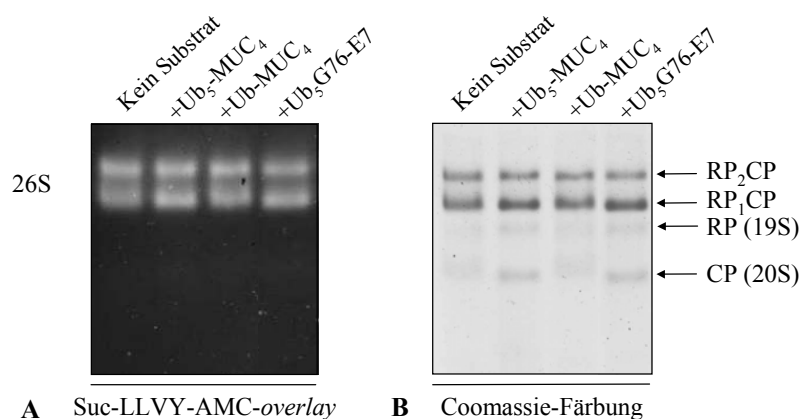


Abb. 37: Zerfall des 26S Proteasoms in seine Subkomplexe durch Prozessierung ubiquitinerter Substrate. 26S Proteasomen (30nM) wurden in einem Tris-gepufferten und ATP-regenerierenden System für 15min bei 37°C mit den Substraten (300nM) Ub₅-MUC₄, Ub-MUC₄ und Ub₅G76-E7 inkubiert. Die Ansätze wurden einer Gradienten-Nativ-PAGE und **(A)** einem Peptid-overlay mit 100μM Suc-LLVY-AMC bzw. **(B)** einer Coomassie-Färbung unterzogen. Die Pfeile geben die Positionen der proteasomalen Subkomplexe im Nativ-Gel an. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten. RP₂CP: 26S mit 2x19S, RP₁CP: 26S mit 1x19S, RP: 19S Regulator, CP: 20S *core*-Partikel

Um diesem Effekt auf den Grund zu gehen, wurden 26S Proteasomen für 15min mit/ohne Substrat inkubiert und mittels einer scharf trennenden Gradienten-Nativ-PAGE analysiert (Abb. 37). Im Aktivitätstest mittels fluorogenem Peptid-*overlay* wie auch nach Coomassie-Färbung zeigte sich für den Ansatz mit dem Fusionsprotein Ub-MUC₄ das gleiche proteasomale Bandenmuster wie für die Reaktion ohne Substrat. Dagegen demonstrierte die entsprechende Aktivitätsanalyse des Proteasoms mit dem Substrat Ub₅-MUC₄ und in geringerem Maße auch mit Ub₅G76-E7 eine deutliche Stimulierung für zunächst beide 26S-Komplexe, RP₂CP und RP₁CP (Abb. 37A). Allerdings gab die Coomassie-Färbung Aufschluss darüber, dass eine tatsächliche Stimulierung nur bei RP₂CP vorgelegen hatte (Abb. 37B). Denn für diesen Komplex war eine Aktivierung nachzuweisen, obwohl die Coomassie-Färbung des Nativ-Gels eine leicht reduzierte Menge an Komplex anzeigte. Dagegen ging die verstärkte Bandenintensität im Peptid-*overlay* bei dem RP₁CP Proteasom offensichtlich auf eine Zunahme an Komplexmenge zurück.

Tab. 10: Quantitative Analyse zu den Proteasomkomplexen nach Inkubation mit Proteinsubstraten. Mittels Densitometrie wurde die Bandenintensität der Proteasomkomplexe ermittelt, die auf dem Coomassie-gefärbten Nativ-Gel aus Abb. 37B sichtbar waren. Abb. 37 zeigte die Proteasomenspezies nach Inkubation ohne Substrat bzw. mit den Substraten Ub₅-MUC₄, Ub-MUC₄ und Ub₅G76-E7. Es sind tabellarisch die Mengenverhältnisse (V) angegeben, die für die Proteasomenspezies RP₂CP, RP₁CP, RP (19S) und CP (20S) densitometrisch ermittelt wurden. Zudem ist die durch Zugabe des jeweiligen Substrates verursachte Verhältnisänderung (VÄ) zwischen den Komplexen in Prozent aufgeführt.

| Substrat: | 1 – | 2 Ub ₅ -MUC ₄ | | 3 Ub-MUC ₄ | | 4 Ub ₅ G76-E7 | |
|---|-------|-------------------------------------|------------------|-----------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| | | | VÄ2= (1-2) /1 | | VÄ3= (1-3) /1 | | VÄ4= (1-4) /1 |
| V= RP ₂ CP: RP ₁ CP | 1:1,7 | 1:2,1 | 19% | 1:1,8 | 6% | 1:2,2 | 23% |
| V= RP ₂ CP: RP | 11:1 | 4,7:1 | 57% | 8:1 | 27% | 4:1 | 64% |
| V= RP ₂ CP: CP | 5,4:1 | 3,3:1 | 39% | 4,5:1 | 16% | 3,3:1 | 39% |

Die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten des Coomassie-gefärbten Gels bestätigt, dass die Inkubation mit den Substraten Ub₅-MUC₄ (Spalte 2) und Ub₅G76-E7 (Spalte 4) zu einer deutlichen Verschiebung (um 19% bzw. 23%) des Verhältnisses RP₂CP zu RP₁CP zugunsten von RP₁CP-Komplexen geführt hat (Tab. 10). Der Befund, dass sich auch die Menge an 19S (RP)-Komplexen im Vergleich zu RP₂CP Partikeln (um 57% bei Ub₅-MUC₄ und 64% bei Ub₅G76-E7) sowie an 20S (CP)-Komplexen im Vergleich zu RP₂CP Partikeln (39% bei beiden Substraten) erhöhte, lässt auf einen substratvermittelten Zerfall des RP₂CP 26S Proteasoms in seine Subkomplexe schließen. Die Substratprozessierung scheint nicht nur zu einem proteasomalen *gating*-Effekt zu führen, sondern – vermutlich im Anschluss daran – auch den Zerfall des Komplexes RP₂CP zu bewirken. Dabei entstehen sowohl RP₁CP-Komplexe als auch freie 19S Regulatoren und 20S *core*-Partikel, die bei Reassoziaton für einen neuen Substratprozessierungs-Zyklus zur Verfügung stehen. Dieses Phänomen der Proteasomdestabilisierung durch ubiquitinierte MUC1-Derivate deutet auf einen Mechanismus hin, über den die Zusammensetzung der zellulären Proteasomenpopulation und damit die Quantität und Qualität der Proteinprozessierung regulierbar wäre.

4 DISKUSSION

4.1 DAS UFD-BASIERTE *IN VITRO* SYSTEM ZUR ANALYSE DER 26S PROTEASOMALEN PROZESSIERUNG UBIQUITINIERTER MODELLSUBSTRATE

Die essentielle Bedeutung des 26S Proteasoms für den regulierten Abbau des Großteils intrazellulärer Proteine und sein Potential als medizinisches „Ziel“, z.B. bei der Verwendung von Inhibitoren zur Tumorbekämpfung (u.a. Bortezomib), wie auch als „Instrument“ beim Einsatz von Proteasomen-basierten Polyepitop-Vakzinen macht die Notwendigkeit einer detaillierten Analyse dieses Proteolysesystems evident (Lightcap *et al.*, 2000; Orłowski, 2004; Teicher *et al.*, 1999). Die von Thrower *et al.* 2000 publizierte Methode auf der Grundlage des UFD-Weges eröffnete erstmals die Möglichkeit, ³⁵S markierte Substrate definiert zu ubiquitinieren und deren *in vitro* Abbau durch das 26S Proteasom zu untersuchen (Thrower *et al.*, 2000).

Es gelang in der vorliegenden Arbeit auf Basis des genannten Verfahrens sowohl das E7-Protein des Humanen Papillomvirus Typ16 (HPV16) als auch Derivate des tumorassoziierten Antigens Mucin1 (MUC1) in größerem Maßstab und unter Verzicht auf eine radioaktive Markierung rekombinant zu gewinnen und zu penta-ubiquitinieren. Die Auswertung der sich anschließenden *in vitro* Prozessierungsexperimente hat allerdings nur für die ubiquitinierten MUC1-Derivate eine Fragmentgenerierung durch proteasomale Proteolyse ergeben.

4.1.1 Das penta-ubiquitinierte HPV16 E7-Protein

Das penta-ubiquitinierte HPV16 E7-Protein wurde *in vitro* zwar durch intrinsische bzw. proteasomenassoziierte Faktoren deubiquitiniert, aber die Entstehung von kleineren Produkten durch Proteolyse konnte weder mittels Western Blots noch massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Dabei erfolgte eine Deubiquitinierung durch das 26S Proteasom nur bei dem penta-ubiquitinierten E7-Substrat, das innerhalb des Ub-E7-Fusionsproteins ein Wildtyp-Ubiquitin enthielt (Ub₅G76-E7) und nicht bei jenem, das die Ub-Mutante UbV76 beherbergte (Ub₅V76-E7) (Abb. 13, 16). Die Spaltung der Ub-E7 Fusion war also durch die UbV76-Mutation komplett unterbunden, was Yao *et al.* auch für das Substrat Ub₅V76-DHFR gezeigt hatten (Yao & Cohen, 2002). Die Studie von Yao *et al.* dokumentiert, dass die proteasomale Prozessierung von Ub₅G76-DHFR zu einer annähernd vollständigen Freisetzung des Ub₅ und zu einem schnellen Substratabbau führte, während die fehlende Deubiquitinierung innerhalb des Fusionsproteins von Ub₅V76-DHFR eine primäre Abspaltung von Ub₄ und eine verlangsamte Proteolyse zur Folge hatte. Diese Beobachtung wurde mit der geschwindigkeitsbestimmenden Rolle der Deubiquitinierung erklärt, die hier von der Zn²⁺-abhängigen 19S Untereinheit Rpn11 ausgeübt wurde.

Im Gegensatz zu den DHFR-enthaltenden Substraten war das Protein HPV16 E7 weder in Form von Ub₅V76-E7 noch als Ub₅G76-E7 *in vitro* degradierbar. Der mangelhafte Abbau ging nachweislich nicht auf unfunktionelle – aus humanen Erythrozyten isolierte – 26S Proteasomen zurück. Denn es konnten mittels Western Blots in den 26S-Komplexen die für die Substraterkennung

mitverantwortliche und leicht dissoziierbare Untereinheit Rpn10 sowie die Deubiquitinase Rpn11 detektiert werden. Zudem war unter Verwendung derselben Proteasompräparation die *in vitro* Degradation des Substrates Ub₅V76-DHFR, das von C. Pickart zur Verfügung gestellt wurde, erfolgreich.

Reinstein *et al.* hatten den ubiquitin- und proteasomabhängigen Abbau des HPV16 E7-Proteins sowohl im Zellmodell als auch in einem zellfreien Ansatz unter Verwendung von ³⁵S-markiertem E7, Ubiquitin und Fraktion II nachgewiesen (Reinstein *et al.*, 2000). Fraktion II ist ein Proteingemisch, das alle für die Proteolyse ubiquitinierten Substrate nötigen Faktoren enthält (Ciechanover *et al.*, 1980; Hershko *et al.*, 1980). Beispielsweise wurde für die Proteine hHR23a/b und Dsk2/Ubiquilin1/2, die aufgrund vorhandener UBA- und UBL-Domänen zur Bindung von Poly-Ubiquitin und Proteasom in der Lage sind, eine Funktion als Substrattransporter und damit eine abbauunterstützende Rolle gezeigt (Chen *et al.*, 2001; Funakoshi *et al.*, 2002; Wilkinson *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit führte allerdings die Inkubation der E7-enthaltenden Substrate mit Fraktion II wie in dem Ansatz mit isolierten 26S Proteasomen nur zur Substrat-Deubiquitinierung (Abb. 17).

Den vorgestellten Ergebnissen zufolge ist die mangelnde Proteolyse nicht in einem defizitären *in vitro* Abbausystem, sondern in der Art des Substrates begründet. Möglicherweise war im *in vitro* Ansatz die Eigenschaft des E7-Proteins, die proteasomale *base*-Untereinheit Rpt2 zu binden, dem eigenen Abbau abträglich. Zwar beobachteten Berezutskaya *et al.*, dass rekombinantes E7-Protein über seinen C-Terminus an Rpt2 bindet und dessen ATPase-Aktivität stimuliert (Berezutskaya & Bagchi, 1997). Aber für das dem E7-Protein in den NH₂-terminalen Bereichen (*conserved region* 1 und 2, kurz: CR1, CR2) und der carboxyterminalen Region homologe E1A-Protein des Adenovirus Typ5 ist das Gegenteil gezeigt. Turner *et al.* konnten eine Bindung von Ad5 E1A an die proteasomalen Untereinheiten Rpt2 und Rpt6 nachweisen, die mit einer reduzierten ATPase-Aktivität einherging (Turnell *et al.*, 2000).

Die nach Glycerolgradienten-Zentrifugation ermittelte co-Fraktionierung des penta-ubiquitinierten E7-Proteins mit dem 26S Proteasom und in geringerem Maße mit dem 19S Regulator ist ein Indiz für die Bindung des ubiquitinierten E7-Substrates an den 19S-Komplex (Abb. 25). Diese war aber nicht besonders stark ausgeprägt. Sie kann – den Daten von Berezutskaya *et al.* entsprechend – durch das E7-Protein vermittelt worden sein oder erfolgte über die Ubiquitinmarkierung. Unerwartet war aber die wesentlich deutlichere co-Sedimentation von Ub₅G76-E7 mit dem 20S *core*-Partikel. Der saure Charakter des E7-Proteins, der sich u.a. in einem veränderten Laufverhalten des Proteins während einer Gelelektrophorese widerspiegelt, könnte eine Interaktion mit positiv geladenen Oberflächenabschnitten des Proteasoms ermöglichen (Armstrong & Roman, 1993). Die Analyse der peptidspaltenden Proteasomaktivität nach Inkubation mit Ub₅G76-E7 widerspricht allerdings der Vermutung, dass die mögliche Interaktion des ubiquitinierten E7-Proteins mit dem 19S- und 20S-Komplex zu einer Beeinträchtigung der proteasomalen Aktivität und deshalb zu einem defizitären Abbau geführt haben könnte. Es konnte in Abhängigkeit von der Konzentration an Ub₅G76-E7 sogar eine leicht erhöhte peptidspaltende Aktivität des 26S Proteasoms festgestellt werden (Abb. 26C). Diese Proteasomstimulierung war bei Verwendung der ubiquitinierten MUC1-Derivate noch

deutlicher ausgeprägt und wurde – weiteren Untersuchungen nachfolgend – als substratvermittelter *gating*-Effekt interpretiert (siehe Kapitel 4.2).

Für den durch Ub₅G76-E7 induzierten, wenn auch mäßigen *gating*-Effekt ergeben sich zwei Erklärungsmöglichkeiten: Die Proteasomaktivierung ist wie im Fall der ubiquitinierten MUC1-Derivate die Folge einer initialen proteasomalen Prozessierung (Substratbindung, Deubiquitinierung bzw. Entfaltung) oder sie spiegelt die von Berezutskaya *et al.* beobachtete Fähigkeit des E7-Proteins wider, die ATPase-Untereinheit Rpt2 zu stimulieren (Berezutskaya & Bagchi, 1997). Bisher ist nämlich ausschließlich für die 19S Untereinheit Rpt2 gezeigt, dass sie für das *gating* des 20S *core*-Partikels essentiell ist (Kohler *et al.*, 2001). Es lässt sich nur spekulieren, warum trotz dieses proteasomaktivierenden Effektes Ub₅G76-E7 *in vitro* nicht vom 26S Proteasom degradiert wurde. Möglicherweise war die für die Substratdegradation essentielle Bindung an den 19S Regulator zu schwach. Auch lässt sich durch die Interaktion des Proteins mit dem 20S *core*-Partikel ein hemmender Einfluss auf die proteinspaltende Aktivität des Proteasoms nicht ausschließen. Zudem ist denkbar, dass der E7-Anteil innerhalb des Ub₅G76-E7 durch Oligomerbildung, wie sie *in vitro* für das E7-Protein beobachtet wurde, eine Substratentfaltung behindert und damit die Substratdegradation verhindert hat (Alonso *et al.*, 2004).

Es lässt sich konstatieren, dass das Protein HPV16 E7 nicht als Modellsubstrat für das UFD-basierte proteasomale *in vitro* Abbausystem geeignet ist. Das System erlaubt damit nicht – wie erhofft – in einer Art Durchsatzverfahren die Analyse eines jeden Proteins, dessen 26S proteasomale Prozessierung aus biochemischer oder immunologischer Sicht von Interesse ist.

4.1.2 Penta-ubiquitinierte Mucin1-Derivate

Die MUC1-Derivate Ub₅-MUC₄, Ub₅-MUC₈ und Ub₅-MUC_{long} wurden *in vitro* durch das 26S Proteasom innerhalb von 2h nahezu vollständig degradiert (Abb. 19). In Kontrollansätzen konnte stellvertretend für die MUC1-Derivate anhand des Substrates Ub₅-MUC₄ bzw. des abgeleiteten Fusionsproteins und unter Einsatz des 26S bzw. 20S Proteasoms bestätigt werden, dass der *in vitro* Umsatz die Eigenschaften des 26S Proteasoms erforderte und umgekehrt das 26S Proteasom nur Proteine prozessierte, die mit Ub₄ das minimale proteasomale Erkennungssignal aufwiesen (Abb. 20).

Der 26S proteasomale Abbau von Ub₅-MUC₄ wurde durch Verwendung des Zn²⁺-Chelators o-PT deutlich gehemmt und durch das alkylierende Agens NEM komplett blockiert (Abb. 19). NEM gilt als klassischer Inhibitor der Cystein-Proteasen und wird üblicherweise *in vitro* in einer Konzentration von 5mM eingesetzt, um Cystein-Deubiquitinasen vollständig zu inaktivieren. Die Analyse der Proteasomintegrität nach NEM-Behandlung zeigte allerdings einen Zerfall des 26S Proteasoms in seine Subkomplexe (Abb. 26A, B). Damit dokumentiert die durch NEM verursachte Hemmung des Substratabbaus nicht die Abhängigkeit der proteasomalen Prozessierung von der Substratdeubiquitinierung, sondern von der Proteasomintegrität. Durch den Zn²⁺-Chelator o-PT war keine Beeinträchtigung der Proteasomstabilität bzw. seiner peptidspaltenden Aktivität festzustellen (Daten nicht gezeigt; Abb. 30C). Die abbauhemmende Wirkung von o-PT geht damit sehr

wahrscheinlich auf die Komplexierung von Zn^{2+} -Ionen und die folgende Inaktivierung der Zn^{2+} -abhängigen 19S Untereinheit Rpn11 zurück. Die für Rpn11 beschriebene Fähigkeit, lineare Ub-Substrat-Fusionen zu spalten und somit zur Deubiquitinierung beizutragen, scheint demnach initial und Voraussetzung für die weitere proteasomale Substratprozessierung zu sein (Verma *et al.*, 2002; Yao & Cohen, 2002).

Der Einsatz des Proteasominhibitors MG132 führte zu einer teilweisen Stabilisierung der drei Substrate, der entstehenden Fusionsproteine bzw. der deubiquitinierten Form MUC_{long} (Abb. 19A, 22). Dieses Ergebnis verifiziert die Abhängigkeit der Substratprozessierung von einem funktionellen Proteasom. Die MG132-vermittelte Substratstabilisierung war deshalb nicht vollständig, weil der Proteasominhibitor die Deubiquitinierung nicht verhindert, nur behindert. Dies lässt eine Kopplung zwischen Deubiquitinierung und Proteolyse erkennen, die sich auch in der Stabilisierung ubiquitinierten Intermediate unter Verwendung der ATP-depletierenden Apyrase präsentierte (Abb. 19B, 22). Obwohl der Vorgang der Deubiquitinierung per se kein ATP erfordert, haben auch Yao *et al.*, Verma *et al.* und Guterman *et al.* eine ATP-Abhängigkeit der Deubiquitinierung beobachtet (Guterman & Glickman, 2004a; Verma *et al.*, 2002; Yao & Cohen, 2002). Diese kann erstens mit der durch ATP-Depletion beeinträchtigten Fähigkeit der ATPase Rpt5 zusammenhängen, ubiquitinierte Substrate zu binden (Lam *et al.*, 2002). Denn damit wäre das Substrat den proteasomassoziierten Deubiquitinasen entzogen. Zweitens lässt sich der Befund als Folge einer sterischen Behinderung interpretieren, die eine Deubiquitinierung bei blockierter Proteolyse bzw. inhibierter *gating*- und Entfaltungsfunktion (durch MG132 bzw. Apyrase) erschwerte. Drittens führt eine ATP-Depletion mit der Zeit zur Dissoziation des 19S Regulators vom 20S *core*-Partikel und damit zur Entkopplung der deubiquitinierten von der proteolytischen Proteasomkomponente.

Bei der Etablierung einer massenspektrometrischen Methode zur Analyse der Produkte, die aus den UFD-basierten Abbauxperimenten hervorgingen, traten enorme Schwierigkeiten auf. Diese waren auf die komplexe Zusammensetzung der Degradationsansätze zurückzuführen. Erst mittels der Methode der (HPLC)-MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie ((HPLC)-MALDI-MS) gelang die Vermessung und Auswertung der Proben. Die massenspektrometrische Analyse der Produkte aus den Abbauxperimenten zum Zeitpunkt 15min hatte für die drei Substrate $\text{Ub}_5\text{-MUC}_4$, $\text{Ub}_5\text{-MUC}_8$ und $\text{Ub}_5\text{-MUC}_{\text{long}}$ die Generierung von Produkten sowohl aus dem MUC_x -Bereich (Epitop bzw. Mehrfachepitop bei den Polyepitop-Substraten) als auch aus dem Ubiquitin-Anteil ergeben (Abb. 23, 24). Offensichtlich ist das 26S Proteasom *in vitro* auch zur Entfaltung und Degradation des sehr stabilen Ubiquitins in der Lage. Die hohe Konzentration an Ubiquitin bzw. die lineare Fusion zwischen Ubiquitin und dem proteasomalen Substrat MUC_x können den Ubiquitinabbau begünstigt haben. Es ist aber auch denkbar, dass die Degradation von Ubiquitin durch das 26S Proteasom eine Möglichkeit widerspiegelt, wie Ubiquitin aus dem UPS-System entfernt werden kann.

Ein quantitativer Vergleich der aus den verschiedenen Substraten hervorgegangenen Produkte mittels separater MALDI-MS-Analysen war erschwert. Denn die jeweils separate Behandlung der zu analysierenden Proben (Entfernung von Salz und Glycerol mittels TopTip Filtrationseinheiten sowie möglicherweise ungleiche Probenverteilung in der MALDI-Matrix) hätte zu Veränderungen führen

können, die eine ausschließlich methodische Ursache haben. Um dennoch eine Abschätzung quantitativer Unterschiede zu ermöglichen, wurde der Vergleich auf Basis eines Referenzsignals erstellt, das in allen Massenspektren nachzuweisen und substratfremd war. Danach war in den Ansätzen mit den Polyepitop-Substraten erwartungsgemäß mehr freies Epitop zu detektieren als mit Ub₅-MUC_{long}, aus dem neben dem Epitop auch ein NH₂-terminal verlängerter Epitopvorläufer von 18 Aminosäuren Länge generiert wurde (Tab. 5, Abb. 24). Diese Ergebnisse bestätigen die von der Gruppe um A. Goldberg präsentierten Daten zum 26S proteasomalen Abbau nicht ubiquitinierten Substrate (Cascio *et al.*, 2001). Cascio *et al.* konnten für isolierte 26S- und 20S-Komplexe zeigen, dass sie aus Ovalbumin Epitope und NH₂-terminal-verlängerte Vorläufer generierten. Zudem demonstrierten Kisselev *et al.* anhand bereits denaturierter Proteine einen prozessiven Abbaumechanismus für das 26S Proteasom (Kisselev *et al.*, 1999b). Allerdings scheint im Fall der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substrate die proteasomale Prozessivität mit der Anzahl der substratinternen Epitope zu korrelieren. Während nämlich aus dem Substrat Ub₅-MUC_{long} mehr Fragmente der Länge 18-23 Aminosäuren hervorgingen, wurden aus den Polyepitop-Substraten vorwiegend Produkte um Epitopgröße generiert. G. Hoffmann konnte in *in vitro* Abbauxperimenten mit dem 20S Proteasom und der Dreifachfolge des MUC1-Epitopes als Substrat zeigen, dass das Epitop auch durch das 20S Proteasom mit hoher Genauigkeit generiert wird (Hoffmann, 2004). Offensichtlich ermöglicht die Epitop-Sequenz (z.B. das C-terminale Val) in Mehrfachfolge eine optimale Substratbindung mit hoher Affinität in bzw. an den entsprechenden proteasomalen Bindungstaschen im *core*-Partikel, was zu einer präzisen Epitopgenerierung führt. Daneben lässt der Befund, dass das Epitop bereits 2,5min nach Inkubation des Substrates Ub₅-MUC₄ mit dem 26S Proteasom nachweisbar war, eine sehr hohe Effizienz der Substratprozessierung erkennen, die sehr wahrscheinlich auf einer durch die Ubiquitinmarkierung verbesserten Substratbindung basiert.

4.2 DER SUBSTRATINDUZIERTER GATING-EFFEKT

Die Analyse der Proteasomaktivität nach Inkubation mit ubiquitinierten MUC1-Derivaten bzw. dem Protein Ub₅G76-E7 hatte insbesondere durch erstgenannte Substrate eine deutliche Stimulierung der drei proteasomalen Peptidaseaktivitäten ChT-L, T-L und PGPH ergeben (Abb. 26C, 29, 32). Die nach Glycerolgradienten-Zentrifugation ermittelte co-Fraktionierung der ubiquitinierten Substrate mit dem 26S-Komplex deutete darauf hin, dass der proteasomaktivierende Effekt durch eine Interaktion zwischen Substrat und 26S Proteasom zustande kam (Abb. 25). Während die im Aktivitätstest ermittelte Proteasomstimulierung durch die MUC1-Substrate dem Zwei- bis Dreifachen der Grundaktivität entsprach, fiel der mittels Nativ-PAGE/fluorogenem Peptid-*overlay* bestimmte aktivierende Effekt geringer aus (Abb. 26A, B). Die reduzierte Aktivierung war vermutlich das Resultat einer zum Teil erfolgten Dissoziation des Substrates vom 26S-Komplex im Verlauf der Gelelektrophorese.

Die substratinduzierte Stimulierung setzte sofort bei Substratzugabe ein und war nach 5-15min maximal (Abb. 28). Die folgende Reduktion fiel zeitlich mit dem Zerfall eines Anteils der 26S Proteasommenge zusammen, was auf eine Korrelation hinweist, die in Kapitel 4.5 erörtert wird. Die

Stimulierung war nicht an die Funktion der als Hauptaktivität geltenden Proteasomuntereinheit $\beta 5$ gebunden. Deren Inaktivierung durch clasto-Lactacystin hemmte zwar die Suc-LLVY-AMC-spaltende-Aktivität vollständig, die T-L- und die PGPH-Aktivität waren aber nach wie vor auf das 2,5fache der Grundaktivität stimulierbar (Abb. 32). Weil also die Stimulierung der drei untersuchten Peptidaseaktivitäten ChT-L, T-L und PGPH nicht nur gleich stark ausfiel (ohne Inhibitor), sondern auch unabhängig voneinander erfolgte (mit Inhibitor), kann die Proteasomaktivierung auf einen substratinduzierten allgemeinen *gating*-Effekt zurückgeführt werden.

Die Proteasomstimulierung wurde nur durch die getesteten penta-ubiquitinierten Substrate, nicht aber durch die analogen Substrate ohne Ubiquitin bzw. das einzelne MUC1-Epitop vermittelt (Abb. 27), was die Bedeutung der Ubiquitin-Markierung für den aktivierenden Effekt offensichtlich macht. Zudem zeigte sich die Stimulierbarkeit spezifisch für den 26S-Komplex, denn 20S Proteasomen waren durch ubiquitinierte oder ubiquitinfreie Substrate nicht aktivierbar (Abb. 27). Dieses Ergebnis demonstriert, dass der für den 26S-Komplex ermittelte *gating*-Effekt nicht auf der von Schmidtke *et al.* und Kisselev *et al.* beobachteten Proteasomstimulierung basiert, die durch Bindung hydrophober Peptide an postulierte *modifier sites* am 20S Proteasom induziert wird (Kisselev *et al.*, 2002; Schmidtke *et al.*, 2000).

Das Resultat, dass nur die pentaubiquitinierten MUC1-Derivate, nicht aber die korrespondierenden Ub-MUC1-Fusionsproteine bzw. freies Tetra-Ubiquitin zur Proteasomstimulierung in der Lage waren (Abb. 30), lässt sich mit den für die genannten Substrate unterschiedlichen Affinitäten zum Proteasomkomplex erklären. Die Bindung der Substrate an das Proteasom erfolgt über die als Markierung fungierende Ubiquitin-Kette, die mit zunehmender Länge eine festere Bindung erlaubt (Thrower *et al.*, 2000). Thrower *et al.* demonstrierten zudem für die Proteasombindung durch freies Tetra-Ubiquitin eine fünffach höhere Dissoziationskonstante als für die Bindung durch das Substrat Ub₅-DHFR, das in seiner Konstruktion den ubiquitinierten MUC1-Derivaten analog ist. Die geringere Affinität von Tetra-Ubiquitin war auf die negative Ladung der Carboxygruppe am proximalen Ende des Moleküls zurückzuführen, die die Proteasombindung beeinträchtigt und im Substrat Ub₅-DHFR in einer neutralen Isopeptidbindung eingebunden ist. Auch das Substrat Ub₅G76-E7 enthält wie die ubiquitinierten MUC1-Derivate einen Penta-Ubiquitin-Anteil. Aber der Hinweis auf die starke Bindung des ubiquitinierten E7-Proteins an den 20S-Komplex und die schwache an den 19S-Komplex lässt auf eine niedrige Affinität von Ub₅G76-E7 zum 19S Regulator schließen, was sein reduziertes Potential begründet, die 26S Proteasomaktivität zu steigern. Auf Basis dieser Daten ist zu schlussfolgern, dass die für die untersuchten Substrate unterschiedlich ausgeprägte Fähigkeit, die peptidspaltende Aktivität des 26S Proteasoms zu stimulieren, auf den verschiedenen Affinitäten der Substrate zum 19S-Komplex beruht. Dabei ist nicht nur die Präsenz des Penta-Ubiquitins innerhalb des Substrates ausschlaggebend, sondern auch der biochemische Charakter des Nicht-Ub-Anteils.

Neben der Substratbindung an den 19S-Komplex ist auch die Substratdeubiquitinierung Voraussetzung für den stimulierenden Effekt, denn der Zn²⁺-Chelator und Rpn11-Inhibitor o-PT reduzierte die Aktivierung (Abb. 32). Guterman *et al.* war es möglich, im Hefesystem für die deubiquitinierenden Enzyme Rpn11 und USP14/Ubp6 eine komplementäre Funktion bei der Spaltung

von Ub-GFP-Fusionen nachzuweisen (Guterman & Glickman, 2004a). Dieses Resultat erklärt, warum der Einsatz des Rpn11-Inhibitors o-PT nur zu einer Reduktion, nicht aber zu der Aufhebung von Deubiquitinierung und Proteasomstimulierung führte. Der substratvermittelte *gating*-Effekt war außerdem abhängig von der Bindung und Hydrolyse von ATP (Abb. 31).

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich das folgende Modell entwickeln: Die Bindung eines pentaubiquitinierten Substrates an das 26S Proteasom, die Substratdeubiquitinierung und ein ATP-abhängiger Prozessierungsschritt induzieren einen *gating*-Effekt, der konformationelle Änderungen im α -Ring des 20S *core*-Partikels widerspiegelt und über Untereinheiten des 19S Regulators vermittelt wird. Das 20S Proteasom ist durch unterschiedliche Regulatoren (*base*-Subkomplex, PA28, 19S), Agenzien (SDS) sowie Mutationen (26S: Rpt2RF) und Deletionen in der NH₂-terminalen Region der Untereinheiten $\alpha 3$ bzw. $\alpha 7$ (20S: $\alpha 3\Delta N$, 20S: $\alpha 3\alpha 7\Delta N$) auf verschiedene Niveaus aktivierbar (Adams *et al.*, 1998; Bajorek *et al.*, 2003; Dubiel *et al.*, 1992; Groll *et al.*, 2000; Rubin *et al.*, 1998; Stohwasser *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 1999). Da also eine sequenzielle Proteasomstimulierung möglich ist, erstaunt der Befund einer zusätzlichen Aktivierbarkeit durch Ub₅-Substrate nicht. Die von Walz *et al.* veröffentlichten Modelle zum 26S Proteasom, welche auf Grundlage der Kristallstruktur des Proteasoms von *T. acidophilum* und der elektronenmikroskopischen Aufnahmen von 26S Proteasomen aus *S. cerevisiae* erstellt wurden, weisen darauf hin, dass die Verbindung zwischen dem 19S Regulator und dem 20S Proteasom *ex vivo* nicht nur fragil ist, sondern wahrscheinlich einer steten Bewegung (*wagging motion*) unterliegt (Walz *et al.*, 1998). Unter Berücksichtigung dieser Daten ist plausibel, dass die Bindung eines ubiquitinierten Substrates den 26S-Komplex initial stabilisiert. Im Verlauf der Substratprozessierung kommt es zur Ausbildung eines Konformationszustandes, der eine stabilisierte Öffnung des 20S α -Ringes ermöglicht und so einen optimierten Substrateinstrom mit verbesserter Substratbindung gewährt.

Die Frage, welcher der genannten Substratprozessierungsschritte den *gating*-Effekt auslöst, ließ sich experimentell wegen methodischer Limitierungen im Säugerzell-System nicht eindeutig beantworten. Die Beeinträchtigung des stimulierenden Effektes durch o-PT weist auf die Bedeutung der Deubiquitinierung durch Rpn11 für die Aktivierung hin. Allerdings ist ein direkter Einfluss dieser Untereinheit auf den α -Ring nicht sehr wahrscheinlich, da für sie eine distale Position am *lid*-Subkomplex des 26S Proteasoms angenommen wird (Ferrell *et al.*, 2000; Verma *et al.*, 2002). Das Deubiquitinierungsenzym USP14/Ubp6 könnte dagegen die Stimulierung direkt unterstützen, da es am *base*-Subkomplex assoziiert nachgewiesen wurde (Guterman & Glickman, 2004a; Leggett *et al.*, 2002).

Sicher ist die unmittelbare Beteiligung eines ATP-hydrolysierenden Prozessierungsschrittes, denn die substratinduzierte Proteasomaktivierung war durch Verwendung des nicht spaltbaren ATP-Analogs ATP γ S hemmbar (Abb. 31). Die zur ATP-Bindung bzw. Hydrolyse befähigten ATPasen Rpt1-Rpt6 des 26S Proteasoms bilden in Form eines hexameren Ringes die Basis des 19S Regulators, die mit den α -Untereinheiten des 20S Proteasoms interagiert. Die proteasomalen ATPasen weisen keine funktionelle Redundanz auf (Rubin *et al.*, 1998). Dies äußert sich z.B. in der eindeutigen Zuordnung der *gating*-Funktion zu Rpt2 und der Poly-Ubiquitin-bindenden Eigenschaft zu Rpt5 (Kohler *et al.*,

2001; Lam *et al.*, 2002). Während die Bindung von Ubiquitin-Konjugaten an die Nicht-ATPase-Untereinheit Rpn10 ATP-unabhängig erfolgt, konnten Lam *et al.* durch *crosslinking*-Experimente für Rpt5 demonstrieren, dass die Bindung von Tetra-Ubiquitin und dem Substrat Ub₅-DHFR die Hydrolyse von ATP erfordert (Deveraux *et al.*, 1994; Lam *et al.*, 2002). Unter Berücksichtigung der bereits dargestellten Bedeutung der Substrataffinität und der Bindung an den 19S Regulator für die Proteasomstimulierung wird eine direkte Beteiligung von Rpt5 plausibel. Diese Untereinheit könnte durch ATP-abhängige Substratbindung direkt auf die benachbarten ATPasen wirken und zum *gating* des proteasomalen α -Ringes beitragen.

Die direkte Teilnahme von Rpt2 an der substratvermittelten Proteasomstimulierung ist dagegen weniger wahrscheinlich. Die von Kohler *et al.* für Rpt2 ermittelte *gating*-Funktion, die durch Bindung des 19S Regulators an den 20S core-Partikel zustande kommt, scheint von der ATP-Bindung und nicht seiner Hydrolyse abzuhängen (Kohler *et al.*, 2001). Darauf weist die Beobachtung von Rubin *et al.* hin, dass im Hefesystem die Mutation K229R im nukleotidbindenden Bereich des Walker-Motivs von Rpt2 zu einem Defekt in der Hydrolyse von Peptidsubstraten führt (Rubin *et al.*, 1998). Und auch die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten unter Verwendung des ATP-hydrolysierenden Enzyms Apyrase bzw. der von ATP-Analoga erhärtet diese Annahme. Es ließ sich eine auf ein Drittel reduzierte peptidspaltende Aktivität des Proteasoms nach Inkubation mit Apyrase feststellen, welche sehr wahrscheinlich auf die beeinträchtigte *gating*-Funktion von Rpt2 zurückzuführen ist (Abb. 31). Eine durch ATP-Depletion induzierbare Dissoziation des 19S Regulators vom 20S core-Partikel, die ebenfalls eine verringerte Proteasomaktivierung zur Folge gehabt hätte, war nicht nachweisbar. Da der durch Apyrase induzierte Verlust an Proteasomaktivität durch die Zugabe von ATP γ S aufgehoben wurde, ist für die Rpt2-vermittelte *gating*-Funktion nur eine Abhängigkeit von der ATP-Bindung anzunehmen. Demgegenüber war der durch Ub₅-Substrate ausgelöste *gating*-Effekt durch ATP γ S hemmbar. Damit wird deutlich, dass die substratvermittelte Proteasomstimulierung nicht auf der ursächlichen Wirkung der Untereinheit Rpt2 basiert.

Die potentiell ATP-abhängigen Prozessierungsschritte Substratentfaltung bzw. -translokation sind im eukaryontischen System bisher nur unzureichend untersucht. Auch eine funktionelle Zuordnung der Prozesse zu den Rpt-Untereinheiten gelang noch nicht. Daten zur proteasomalen Substratentfaltung und -translokation basieren hauptsächlich auf Untersuchungen zu eubakteriellen bzw. archaebakteriellen Proteasekomplexen, die aus einer dem eukaryontischen 20S Proteasom ähnlichen proteolytischen Komponente und einem Regulator bestehen. Im Gegensatz zum eukaryontischen 19S Regulator besteht der archaebakterielle Aktivator PAN aus sechs identischen ATPasen, die wie die *base*-Untereinheiten des 19S-Komplexes zur Triple-A-Familie zählen. PAN stimuliert die Proteindegradation des archaebakteriellen Proteasoms. Ubiquitin existiert in Prokaryonten nicht, die Substratmarkierung erfolgt in Eubakterien z.B. über eine Markierung mit dem ssrA-Peptid. Die Untersuchungen zum PAN-20S-Komplex weisen in ihrer Gesamtheit darauf hin, dass der Prozess der Entfaltung (z.B. eines GFP-SsrA Substrates), der sequenziell und gerichtet erfolgt, die Hydrolyse von ATP erfordert und einen ebenfalls ATP-hydrolysierenden Translokationsschritt nach sich zieht (Benaroudj *et al.*, 2003; Navon & Goldberg, 2001). Dabei konnten Benaroudj *et al.* eine Steigerung

der ATPase-Aktivität auf die Präsenz bzw. Prozessierung des Substrates zurückführen.

Auch für die Substratentfaltung durch das eukaryontische Proteasom wird eine Abhängigkeit von ATP postuliert, denn in diesen Prozess sind nachweislich die ATPasen des 19S Regulators involviert (Braun *et al.*, 1999). Die Substratentfaltung könnte für den in der vorliegenden Arbeit analysierten substratinduzierten *gating*-Effekt ursächlich sein. Zwar ist für den Abbau des Nicht-Ub-Anteils, also der Vierfachfolge des MUC1-Epitops des Substrates Ub₅-MUC₄ keine proteasomenvermittelte Entfaltung notwendig, da das Polypeptid bereits vom 20S *core*-Partikel degradierbar ist. Aber die Beobachtung, dass auch das globuläre Ubiquitin – sehr wahrscheinlich als Teil eines Ub-MUC_x-Fusionsproteins – vom 26S Proteasom fragmentiert wurde, zeigt die Notwendigkeit zur Substratentfaltung. Dagegen spielt der Schritt der Substrattranslokation mit Sicherheit keine initiale Rolle bei der substratinduzierten Proteasomstimulierung, denn er schließt die *base*-vermittelte Substratprozessierung ab.

Die Studien verdeutlichen, dass eine separate Analyse der einzelnen Substratprozessierungsschritte schwierig ist. Denn diese unterliegen zum Teil einer Kopplung, wie sie bereits im Hefesystem zwischen Deubiquitinierung und ATPase-Funktion (Guterman & Glickman, 2004a; Yao & Cohen, 2002) und zwischen Substratentfaltung und Translokation beim archeabakteriellen 20S-PAN-Komplex (Benaroudj *et al.*, 2003) gezeigt wurde. Daher ist auch für die in der vorliegenden Arbeit herausgestellte Abhängigkeit des substratvermittelten *gating*-Effektes von Substratbindung, Deubiquitinierung und ATP-bedingter Prozessierung anzunehmen, dass sie auf einer Kopplung der genannten Schritte beruht. Die 19S Untereinheit Rpt5 ist der Kandidat, mit dem sich die ATP-Abhängigkeit des substratinduzierten *gating*-Effektes plausibel erklären lässt, denn er verbindet die Funktionen von Substratbindung und ATPase. Auch der indirekte bzw. direkte Einfluss von Rpn11 bzw. USP14 auf den ATPase-Ring kann zum *gating*-Effekt beitragen. Dies gilt auch für den ATP-abhängigen Schritt der Entfaltung. Es ist möglich, dass die genannten Prozesse erst in der Summe auf die Konformation des ATPase-Ringes wirken und damit zu einem substratinduzierten *gating* des 20S Proteasoms führen, das einen optimierten Substrateinstrom durch verbesserte Substratbindung ermöglicht.

4.3 DAS ZUSAMMENSPIEL VON PA28 UND 26S PROTEASOMEN

Der Proteasom-Aktivator PA28 wird in allen Zelltypen höherer Eukaryonten exprimiert, was auf eine basale zelluläre Funktion von PA28 hindeutet. *In vivo* und *in vitro* Analysen haben für PA28 eine modulierende Funktion bei der Prozessierung von Antigenen für den MHC Klasse I-Präsentationsweg ergeben (Groettrup *et al.*, 1996; Sijts *et al.*, 2002). Dabei spiegelt sich die Bedeutung des Regulators bei der Etablierung einer Immunantwort auch in der durch das Cytokin IFN γ induzierten Expression der PA28-Gene wider.

Die *in vitro* Abbauxperimente zum Einfluss von PA28 auf die proteasomale Antigenprozessierung haben sich aber bisher weitestgehend auf den Komplex aus 20S Proteasom und PA28 beschränkt. Jedoch ist davon auszugehen, dass *in vivo* insbesondere das Zusammenspiel von PA28 mit dem 26S

Regulator von Bedeutung ist. Diese „Zusammenarbeit“ wäre auf zwei Arten möglich: Zum einen kann durch PA28-20S-Komplexe eine Weiterprozessierung von Produkten erfolgen, die vom 26S Proteasom generiert wurden. Zum anderen kann PA28 innerhalb eines Hybridproteasoms direkt mit einem 26S Proteasom des Typs RP₁CP assoziiert vorliegen (Hendil *et al.*, 1998; Tanahashi *et al.*, 2000). Funktionelle Studien zu den Hybridproteasomen hatten eine zum RP₁CP-Komplex erhöhte Peptidaseaktivität ergeben, die aber in etwa der von 26S-Komplexen mit zwei 19S Regulatoren (RP₂CP) entsprach (Cascio *et al.*, 2002; Kopp *et al.*, 2001). Die *in vitro* Degradation denaturierter Proteine durch Hybridproteasomen führte allerdings nicht zu einem erhöhten Substratumsatz, sondern nur zu einem leicht veränderten Produktspektrum (Cascio *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse waren mit einem PA28-induzierten *gating* bzw. konformationsmodulierenden Effekt begründet worden.

Es war beabsichtigt, das in der vorliegenden Arbeit etablierte *in vitro* Abbausystem unter Verwendung des ubiquitinierten MUC1-Derivats Ub₅MUC₄ zur Klärung der Frage zu nutzen, ob und inwiefern PA28 die proteasomale Prozessierung ubiquitiniertter Substrate beeinflusst. Die Inkubation von aus Erythrozyten isolierten PA28-Komplexen in einem molaren Verhältnis von 3:1 mit einem Proteasomgemisch, das 26S Proteasomen des Typs RP₁CP und RP₂CP sowie wenige freie 20S-Komplexe enthielt, sollte die Abdeckung aller freien PA28-Bindungsstellen am Proteasom und damit auch die Konstituierung von Hybridkomplexen ermöglichen. Es bildeten sich aber hauptsächlich PA28-20S-Komplexe (Abb. 33). Eine Nativ-PAGE mit folgendem fluorogenen Peptid-*overlay* wies für diese Komplexe eine deutlich erhöhte Peptidaseaktivität im Vergleich zu freien 20S *core*-Partikeln aus. PA28 hatte zudem eine leichte Aktivierung des RP₁CP 26S Proteasoms verursacht, die die Formation von wenigen Hybridproteasomen anzeigte. Möglicherweise hätte die Variation des molaren Verhältnisses zwischen PA28 und dem 26S Proteasom die Bildung von mehr Hybridproteasomen ermöglicht. Kopp *et al.* und Cascio *et al.* hatten in ihren Rekonstitutionsansätzen Verhältnisse von 1:1 bzw. 30:1 und 500:1 gewählt.

Die massenspektrometrische Analyse der *in vitro* Prozessierung des Substrates Ub₅-MUC₄ durch die PA28-Proteasomkomplexe ergab erstens eine größere Quantität an Produkten, die auch ohne PA28 generiert wurden und zu denen das Epitop und ein Doppelepito-Vorläufer zählen (Abb. 34). Zweitens konnte die Bildung zusätzlicher Fragmente nachgewiesen werden, die vornehmlich aus dem MUC₄-Anteil entstanden und tendenziell länger waren (18-21AA bzw. 28-31AA) als die ohne PA28 gebildeten. Darunter befanden sich das Doppelepito sowie Produkte, die sich vom Dreifachepito ableiten. Beide Beobachtungen korrelieren mit einer verstärkten Tendenz des Proteasoms, nach hydrophoben bis polaren (gegenüber geladenen) Aminosäuren zu spalten. Eine Zuordnung der Effekte zu den PA28-20S- bzw. Hybridkomplexen war nur eingeschränkt möglich.

Die erhöhte Quantität an Epitop und Doppelepito-Vorläufern geht vermutlich auf PA28-induzierte konformationelle Änderungen im Proteasom zurück, die zu einer verbesserten Substratbindung mit höherer Affinität an die Bindungstaschen im 20S *core*-Partikel führen und die PA28 theoretisch innerhalb beider Komplexe induzieren könnte (Stohwasser *et al.*, 2000). Praktisch ist dieses Phänomen der erhöhten Quantität *in vitro* aber bisher ausschließlich für einen PA28-20S-Komplex gezeigt, der sich in einer verstärkten Generierung bestimmter MHC Klasse I-Epitope aus viralen und

körpereigenen Proteinen (u.a. Tumorantigenen) äußert und damit die Bedeutung von PA28 für das Immunsystem unterstreicht (Niedermann *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2002; van Hall *et al.*, 2000).

Die Bildung tendenziell längerer Fragmente aus dem MUC₄-Anteil ist vermutlich das Resultat eines Abbaus durch den Hybridkomplex. In diesem könnte ein von PA28 induzierter *gating*-Effekt und/oder eine durch PA28 ausgelöste konformationelle Modulierung die Freisetzung größerer Fragmente bewirken, die *in vivo* durch Folgeprozessierung mittels PA28-20S-Komplexe oder ebenfalls IFN γ -induzierter Aminopeptidasen (z.B. LAP, ERAP1) die Epitopgenerierung fördern kann (Benina *et al.*, 1998; Saric *et al.*, 2002). Zudem wird durch größere Fragmente die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Fragmentprozessierung durch Aminopeptidasen nicht zur Epitopzerstörung führt, wie es für 99% der proteasomalen Produkte unter Standardbedingungen ermittelt wurde (Princiotta *et al.*, 2003; Reits *et al.*, 2003). Auch diese beiden Argumente bekräftigen die immunologische Bedeutung von PA28. Die Annahme, dass die aus dem Abbauxperiment mit 26S Proteasomen und PA28 hervorgegangenen längeren Produkte durch Hybridkomplexe generiert wurden, wird durch den Nachweis eines Ub-MUC1-Übergangsfragmentes von 21 Aminosäuren Länge unterstützt. Nur das Hybridproteasom enthält mit dem 19S Regulator eine Komponente, die zur Ubiquitinentfaltung in der Lage ist, und mit PA28 einen Regulator zur Produktlängen-Veränderung. Studien von Cascio *et al.*, die den *in vitro* Abbau nicht ubiquitinierten, denaturierten Substrate durch rekonstituierte Hybridproteasomen analysierten, konnten keine Veränderung der Produktlänge durch PA28 feststellen (Cascio *et al.*, 2002). Es ist aber davon auszugehen, dass sich das Potential des Hybridproteasoms und damit auch die Fähigkeit von PA28, innerhalb dieses Komplexes zur Modulierung von Produktlänge, -quantität und -spezifität beizutragen, auf die Prozessierung ubiquitinierten Substrate beschränkt.

4.4 DIE ROLLE DER PROTEASOMALEN UNTEREINHEIT BETA5 BEI DER SUBSTRATPROTEOLYSE

Die Studien von Rock *et al.* dokumentieren eine defizitäre Abbau der meisten zellulären Proteine und die Inhibition der Generierung von MHC Klasse I-präsentierten Peptiden, wenn die proteasomale ChT-L-Aktivität inaktiviert ist (Rock *et al.*, 1994). Auf Basis dieses Resultats und unter der Annahme, allein die proteasomale Untereinheit $\beta 5$ sei für die Ausübung der ChT-L-Aktivität verantwortlich, wurde das Postulat aufgestellt, dass die katalytische Untereinheit $\beta 5$ für die proteasomale Proteindegradation von essentieller Bedeutung sei. Die im Hefesystem ermittelten Daten von Heinemeyer *et al.* unterstützten diese Hypothese. In Hefezellen führten *missense*-Mutationen in den $\beta 5$ -Allelen zur Akkumulation ubiquitinierten Proteine und eine $\beta 5$ -Inaktivierung mittels T1A-Mutation zur Letalität (Heinemeyer *et al.*, 1997; Heinemeyer *et al.*, 1993). *In vitro* Studien mit 20S Proteasomen aus Hefemutanten, in denen $\beta 1$, $\beta 2$ bzw. $\beta 5$ (teil-)inaktiviert waren, zeigten bei Verwendung fluorogener Peptidsubstrate die erwartete Zuordnung der Untereinheiten zu den Aktivitäten PGPH, T-L und ChT-L (Dick *et al.*, 1998). Die Analyse der Proteasomaktivität hinsichtlich der Spaltung von Enolase demonstrierte dagegen eine Redundanz in den Spaltfähigkeiten der einzelnen β -Untereinheiten (Nussbaum *et al.*, 1998).

Hinweise für eine funktionelle Redundanz auch bei den katalytischen β -Untereinheiten in Mammalia-Proteasomen konnten Oberdorf *et al.* liefern (Oberdorf *et al.*, 2001). Der *in vitro* Abbau des Membranproteins CFTR (*cystic fibrose transmembrane conductance regulator*) mittels Retikulozytenlysates erfolgte unter Verwendung des für $\beta 5$ spezifischen Inhibitors clasto-Lactacystin nur um 40% reduziert, obwohl die mit fluorogenen Substraten ermittelte ChT-Aktivität vollständig inhibiert war. Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der Inhibitor durch Komponenten des Retikulozytenlysates abgefangen bzw. inaktiviert wurde oder andere, nicht von clasto-Lactacystin beeinträchtigte cytosolische Proteasen (z.B. TPPII) zum Abbau von CFTR beitrugen.

Mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit etablierten Methode war es nun möglich, in einem definierten *in vitro* Ansatz mit isolierten 26S Proteasomen die Rolle der Untereinheit $\beta 5$ bei der Proteolyse ubiquitinerter MUC1-Derivate zu untersuchen. Während die Verwendung von 50 μ M clasto-Lactacystin zu einer kompletten Hemmung der mittels fluorogenem Peptidsubstrat Suc-LLVY-AMC bestimmten ChT-L-Aktivität führte, war keine Reduzierung der proteinspaltenden Proteasomaktivität festzustellen (Abb 32, 35, 36). Die Degradationsexperimente mit clasto-Lactacystin hatten für die drei getesteten Substrate Ub₅-MUC₄, Ub₅-MUC₈ und Ub₅-MUC_{long} sogar eine verbesserte 26S proteasomale Fragmentgenerierung ergeben, die sich in einer allgemein erhöhten Produktquantität äußerte (Tab. 8). Dieses Resultat dokumentiert, dass die Untereinheit $\beta 5$ keine essentielle Rolle bei der proteasomalen Proteolyse spielt, wie es postuliert war und dem von Kisselev *et al.* zur Proteinspaltung erstellten Modell des *bite and chew* zugrunde gelegt wurde (Kisselev *et al.*, 1999a). Die Analyse der P1-Positionen zeigte für die Reaktionen mit dem $\beta 5$ -Inhibitor eine leichte Verschiebung in Richtung geladener Aminosäuren, die sich mit der durch clasto-Lactacystin inhibierten peptidspaltenden ChT-L-Aktivität begründen lässt. Der Einsatz von clasto-Lactacystin und die damit verbundene Inaktivierung der Untereinheit $\beta 5$ hatte dagegen keine offensichtliche Veränderung in der Länge der generierten Produkte zur Folge, was der Existenz eines *molecular rulers* zur Bestimmung der Produktlängen widerspricht (Wenzel *et al.*, 1994). Nach diesem Modell ist die Fragmentlänge durch den Abstand zwischen zwei katalytischen Untereinheiten festgelegt und hätte durch Inaktivierung von $\beta 5$ verändert sein müssen.

Die Ergebnisse bestätigen die von Oberdorf *et al.* für die katalytischen β -Untereinheiten des Mammalia-Proteasoms vorgeschlagene funktionelle Redundanz bei der Degradation von Proteinsubstraten. Zwar hat es mit clasto-Lactacystin eine leichte Verschiebung der Spaltpräferenzen in Richtung geladener Aminosäuren gegeben, die sich in der verstärkten Generierung von zuvor nur schwach nachweisbaren Produkten widerspiegelte. Aber die durch ChT-L-Aktivität entstandenen Fragmente waren ebenfalls mit clasto-Lactacystin in erhöhter Quantität gebildet worden. Offensichtlich sind auch $\beta 1$ und $\beta 2$ in der Lage, Proteinsubstrate nach hydrophoben Aminosäuren zu spalten und dies sogar besser, wenn $\beta 5$ ausfällt. Möglicherweise hat die durch $\beta 5$ ausgeführte Proteinhydrolyse zur Zerstörung von Produkten geführt, die folglich nach dessen Inaktivierung in größerer Menge detektierbar waren. Demgegenüber ist für $\beta 5$ auch eine regulative Funktion denkbar, die sich abhängig von der Substratsequenz in einer präferentiellen Bindung des Substrates an die entsprechenden Bindungstaschen der Untereinheit $\beta 5$ äußert und damit den Spaltungen durch $\beta 1$ und $\beta 2$ entzieht.

Für den Effekt der verbesserten Produktgenerierung durch Verwendung von clasto-Lactacystin gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Babbitt *et al.* ermittelten durch *in vitro* Abbauxperimente mit ubiquitiniertem Sic als Substrat, dass der Einsatz des Proteasominhibitors Epoxomicin zu einer Stabilisierung des 26S-Komplexes führt (Babbitt *et al.*, 2005). Das Epoxyketon Epoxomicin bindet – wie clasto-Lactacystin auch – präferentiell an die katalytische Untereinheit $\beta 5$, wobei es sowohl mit der Hydroxylgruppe als auch mit der NH_2 -Gruppe des Thr1 reagiert (Fenteany & Schreiber, 1996; Fenteany *et al.*, 1995). Die Bindung des Inhibitors könnte Konformationsänderungen im Proteasom auslösen, die zu einer Stabilisierung des 26S-Komplexes führen. Weiterhin ist vorstellbar, dass die durch Reaktion von clasto-Lactacystin mit dem Thr1O von $\beta 5$ herbeigeführte Acylierung oder die folgende Deacylierung auf allosterische Weise die Substratbindung und -spaltung durch die Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 2$ begünstigen (Groll *et al.*, 1997). Diese Erklärung ginge konform mit dem von Osmulski *et al.* postulierten Modell, nach welchem durch Acylierung bzw. Deacylierung des Thr1O einer katalytischen β -Untereinheit eine Konformationsänderung des Proteasoms induziert wird (Osmulski & Gaczynska, 2002). Diese Hypothese beruht auf Daten, die durch *atomic force*-mikroskopische Aufnahmen von 20S Proteasomen aus der Spalthefe gewonnen wurden und die die Existenz von geschlossenen tonnen- und offenen zylinderförmigen proteasomalen Konformationszuständen unterstützen.

Generell lässt sich festhalten, dass zur Charakterisierung der proteinspaltenden Eigenschaft des 26S Proteasoms die Verwendung von fluorogenen Peptidsubstraten nicht geeignet ist. Obwohl durch clasto-Lactacystin die mittels fluorogenem Suc-LLVY-AMC bestimmte und $\beta 5$ -vermittelte ChT-L-Aktivität komplett gehemmt war, konnte für die proteasomale Degradation der ubiquitinierten MUC1-Proteinsubstrate nur ein leichter prozentualer Rückgang an hydrophoben Aminosäuren in den P1-Positionen registriert werden. Das Ausschalten von $\beta 5$ war für die Spaltung der MUC1-Derivate nicht von Belang. Kisselev *et al.* konnten ähnliche Resultate aus dem 26S proteasomalen *in vitro* Abbau der nicht ubiquitinierten Substrate Ovalbumin und Calmodulin gewinnen (Kisselev *et al.*, 2006). Auch hier war mittels des Inhibitors NLVS eine nahezu vollständige Hemmung der ChT-L-Peptidase- und nur eine marginal beeinträchtigte Protease-Aktivität nachweisbar. Kisselev *et al.* bestätigten, dass die durch $\beta 5$ ausgeführte Proteinspaltung für viele Substrate nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt und bisher die Rolle von $\beta 1$ und $\beta 2$ beim Proteinabbau unterschätzt wurde. Welche katalytische β -Untereinheit in welchem Maße in die Degradation eines Proteins involviert ist, hängt von der Sequenz des Substrates ab. Dass der Anteil der Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 2$ am allgemeinen Proteinumsatz bisher nicht ausreichend berücksichtigt wurde, lässt sich z.B. an der Studie von Glas *et al.* zeigen, die zu einer kontroversen Diskussion Anlass gegeben hat: Während Glas *et al.* die Generierung der an den Proteasominhibitor NLVS adaptierten Zell-Linie EL4 auf den kompensatorischen Effekt von TPPII bei der Proteolyse zurückführten, haben Princiotta *et al.* proteasomale Restaktivität für das Überleben der Zelllinie ermittelt (Glas *et al.*, 1998; Princiotta *et al.*, 2001).

4.5 DIE DESTABILISIERUNG DES 26S-KOMPLEXES DURCH SUBSTRATPROZESSIERUNG

Die Analyse des Einflusses der Ub₅-Substrate auf die Proteasomaktivität hatte für Ub₅-MUC1_{4/8/long} und Ub₅G76-E7 nicht nur eine mehr bzw. weniger deutlich ausgeprägte Aktivitätsstimulierung demonstriert, sondern auch eine Veränderung der Proteasomstabilität durch das jeweilige Substrat angezeigt. Die co-Inkubation der genannten Substrate mit 26S Proteasomen führte zu einer Verschiebung des Verhältnisses von RP₂CP zu RP₁CP Proteasomen um 19% bzw. 23% zugunsten von RP₁CP, die einherging mit der Freisetzung von 19S Regulatoren (RP) und 20S Proteasomen (Abb. 37, Tab. 10). Mittels Nativ-PAGE und folgendem *overlay* mit fluorogenem Peptidsubstrat konnte die substratinduzierte Proteasomstimulierung bei RP₂CP- und RP₁CP-Komplexen nachgewiesen werden. Allerdings war nicht zu ermitteln, ob der verstärkte Umsatz an fluorogenen Substraten durch die RP₁CP-Komplexe ausschließlich auf der erhöhten Proteasommenge oder auch auf einem *gating*-Effekt beruhte. Die Proteasomdestabilisierung erfolgte nicht durch Ub-Substrat-Fusionsproteine, sondern nur durch die korrespondierenden penta-ubiquitinierten Versionen. Da auch das deubiquitinierbare, aber nicht degradierbare Substrat Ub₅G76-E7 zur Proteasomdestabilisierung führte, sind als Ursache für den Proteasomzerfall initiale proteasomale Prozessierungsschritte, wie Substratbindung oder Deubiquitinierung anzunehmen. Allerdings war nur ein Teil der 26S Proteasomenpopulation von der Destabilisierung betroffen. Es ist vorstellbar, dass trotz eines 10molaren Überschusses an Substrat nicht alle Proteasomen am Substratumsatz beteiligt oder zu diesem in der Lage waren. Zudem reduzierte sich die Menge an ubiquitinierten und damit für den Abbau markierten Substratmolekülen durch vorzeitige Abspaltung der Penta-Ubiquitinkette. Und auch die Akkumulation von Endprodukten im *in vitro* Ansatz kann eine unphysiologische Gleichgewichtsverschiebung in Richtung der Ausgangskomponenten begünstigt haben.

Ein substratvermittelter Abfall des 19S Regulators führt sehr wahrscheinlich an der betroffenen Seite des 20S *core*-Partikels zu einem Verschließen des α -Ringes und würde damit die Richtung und Art der Substratprozessierung vorgeben und den Eintritt anderer Proteine verhindert. Zudem ständen die freien 19S Regulatoren wieder zur Bindung von ubiquitinierten Substraten zur Verfügung und würden nach folgender Assemblierung der beladenen Regulatoren an RP₁CP 26S-Komplexe bzw. 20S *core*-Partikel erneut zur Ausbildung von funktionellen und substratbeladenen 26S Proteasomen beitragen. Ein solches Modell wurde von Rechsteiner entworfen und als *ribosome model* bezeichnet, welches auf den Dissoziations- bzw. Assoziationszyklus der ribosomalen Untereinheiten Bezug nimmt (Hoffman & Rechsteiner, 1997). Nach diesem Modell geht der Dissoziation – wie im Fall der ribosomalen Untereinheiten oder auch beim Chaperonkomplex GroEL/GroES – die Hydrolyse gebundener Nukleotide (GTP bzw. ATP) voraus. Zur Modell-Überprüfung untersuchten Hendil *et al.* den Austausch von 19S Regulatoren zwischen 26S Proteasomen eines Gemisches aus Lysaten von Maus- bzw. humanen Zelllinien und konnten bei 6%-28% der Proteasomen pro Stunde einen solchen Austausch ermitteln (Hendil *et al.*, 2002). Diese Rate wurde allerdings für zu gering befunden, um physiologisch relevant zu sein. Babbitt *et al.* waren in der Lage, für die proteasomale Prozessierung von ubiquitiniertem Sic eine Kopplung zwischen der proteasomalen ATP-Hydrolyse und der Dissoziation des 19S Regulators zu demonstrieren (Babbitt *et al.*, 2005). Sie leiteten aus der

Beobachtung, dass Epoxomicin zur Proteasomstabilität beiträgt, eine Abhängigkeit der Dissoziation von der Proteolyse ab. Allerdings könnten neben einem verhinderten Substratabbau auch konformationelle Effekte Ursache für die inhibitorinduzierte Proteasomstabilisierung sein, wie bereits in Kapitel 4.4 dargestellt wurde.

4.6 DIE REGULIERUNG DES REGULATORS – EIN MODELL ZU DEN DEPENDENZEN ZWISCHEN SUBSTRAT UND PROTEASOM

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten zur 26S proteasomalen *in vitro* Degradation ubiquitiniert MUC1-Derivate dokumentieren, dass diese Substrate sowohl die Aktivität des 26S Proteasoms als auch seine Stabilität beeinflussen und damit zu einer Regulierung des Proteasomkomplexes in der Lage sind. Im Folgenden soll ein Überblick darüber gegeben werden, in welcher Weise die ermittelten Abhängigkeiten zwischen Proteasom und Substrat wirksam sind und welche Folgen sich daraus für einen Zyklus der Prozessierung der genannten Substrate durch das 26S Proteasom ergeben. Abbildung 38 (Schritt 1-10) präsentiert das auf den Ausführungen basierende schematische Modell.

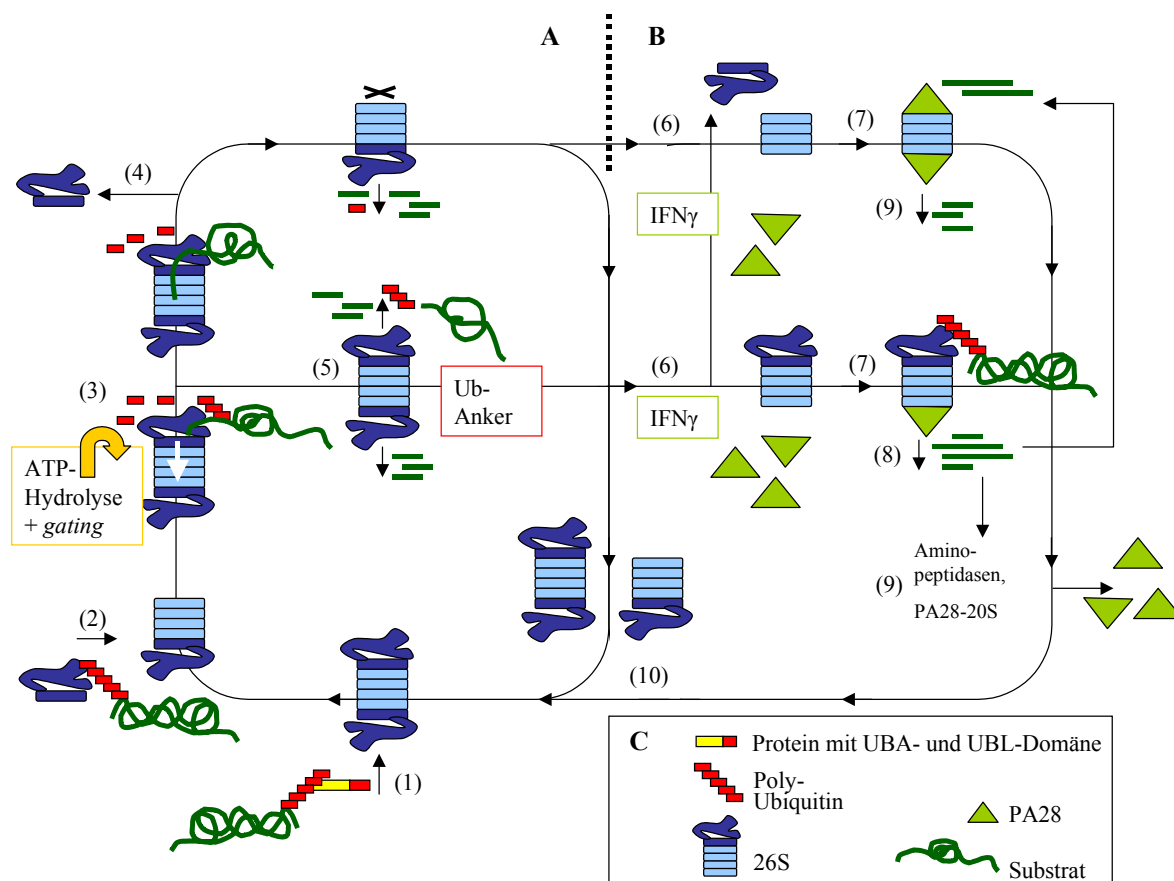


Abb. 38: Modell zum Prozessierungszyklus des 26S Proteasoms. (A) Das 26S Proteasom bei der Prozessierung ubiquitiniert MUC1-Derivate unter Standardbedingungen (1)-(5) und (10). (B) Das 26S Proteasom bei der Prozessierung ubiquitiniert Substrate unter dem Einfluss von IFN γ (6)-(10). Dabei wurde ausschließlich dessen Effekt auf die Proteasomstabilität und die PA28-Expression berücksichtigt. (C) Legende

Ubiquitinierte Substrate können durch UBA/UBL-Transferproteine (1) oder durch freie 19S Regulatoren (2) gebunden und an 26S Proteasomen (RP₂CP bzw. RP₁CP) transferiert werden. Durch das gebundene Substrat wird möglicherweise die ATP-abhängige Assoziation von Regulator und 20S *core*-Partikel stabilisiert. Initiale proteasomale Prozessierungsschritte einschließlich eines ATP-hydrolysierenden Prozesses führen im Fall der Ub₅-MUC_x Substrate zu einem *gating*-Effekt, der vermutlich die Substrataufnahme forciert und auch die weitere Prozessierung moduliert (3). Dieser Vorgang könnte bei paralleler Deubiquitinierung zur Ablösung des 19S Regulators führen, der damit wieder zur Substratrekrutierung und Proteasom-Zusammenführung zur Verfügung steht. Die Dissoziation des ehemals beladenen 19S Regulators könnte dabei die Folge von substratvermittelter ATP-Hydrolyse sein, die den Komplex destabilisiert (4). Im Fall von Substraten, deren Degradation nicht prozessiv verläuft, wäre durch substratinterne Sequenzen oder eine besonders umfangreiche Ubiquitinierung die Arretierung einer stabilen 26S Konformation denkbar, die mittels der als Anker fungierenden Ubiquitinmarkierung die Freisetzung von Intermediaten erlaubt (5). Nach erfolgter vollständiger Prozessierung stehen die 26S-Komplexe für einen neuen Assoziations- und Abbauzyklus zur Verfügung (10).

Das Cytokin IFN γ beeinflusst das Ubiquitin-Proteasom-System auf verschiedenen Stufen. Folgend werden ausschließlich dessen Einfluss auf die Proteasomstabilität und die Expression des Proteasom-Aktivators PA28 in die Betrachtung des proteasomalen Prozessierungszyklus einbezogen. Im Zellsystem führt IFN γ zu einer Reduktion an 26S-Komplexen, die vermutlich aus einer IFN γ -induzierten Proteasomdestabilisierung resultiert (6). Die parallel verstärkte Expression der PA28 α - bzw. β -Gene fördert die Bildung von PA28-20S- und Hybridkomplexen (7). Letztere ermöglichen eine immunmodulierte Degradation von ubiquitinierten Substraten und generieren tendenziell längere Fragmente (8), aus denen nach Prozessierung durch z.B. PA28-20S-Komplexe, 20S (Immuno-) Proteasomen bzw. Aminopeptidasen mit höherer Wahrscheinlichkeit MHC Klasse I-Epitope hervorgehen (9) und final präsentiert werden. Mit nachlassender IFN γ -Stimulierung verringert sich die Menge an PA28, was zur Freisetzung der Proteasomen führt (10). Dieses Modell zur Dynamik innerhalb der 26S Proteasompopulation gibt eine Erklärung für den Befund, dass sich in der Zelle alle Proteasomtypen nachweisen lassen, sich deren Anteil an der gesamten Proteasompopulation jedoch in moduliertem Cytokinmilieu (z.B. bei erhöhter IFN γ -Konzentration) verändert.

4.7 DAS UFD-BASIERTE *IN VITRO* DEGRADATIONSSYSTEM – VON DEN GRUNDLAGEN ZUR ANWENDUNG

Das in der vorliegenden Arbeit etablierte *in vitro* Abbausystem auf Basis des UFD-Degradationsweges und unter Verwendung ubiquitinerter MUC1-Derivate hat eine detaillierte Analyse einzelner 26 proteasomaler Prozessierungsschritte ermöglicht und zum Verständnis beigetragen, wie PA28 und die katalytische Untereinheit β 5 den Abbau der genannten Modellsubstrate beeinflussen. Das *in vitro* System ist besonders geeignet, die Rolle von regulatorischen Proteinen bzw. inhibitorischen Agenzien bei der proteasomalen Substratprozessierung zu eruieren. Um herauszufinden, welche proteasomalen Untereinheiten von der Regulierung betroffen sind und diese weiterleiten, wären Studien mit 26S

Proteasomen aus anderen Spezies (z.B. Hefe- bzw. Bakterienstämme) hilfreich, deren proteasomale Untereinheiten sich genetisch relativ unkompliziert manipulieren lassen. Allerdings gilt es in diesen Fällen zu berücksichtigen, dass das Mammalia-Proteasom sich zum Teil strukturell und funktionell von den in Hefe und Bakterien Homologen unterscheidet.

Insbesondere die Analyse der 26S proteasomalen Substratprozessierung unter Verwendung des $\beta 5$ -spezifischen Inhibitors clasto-Lactacystin hat das vorgestellte UFD-basierte Abbausystem als eine viel versprechende Methode ausgewiesen, um den Einfluss von Inhibitoren auf die Prozessierung ubiquitinierten Substrate zu testen, die von immunologischem Interesse sind. Es lässt sich auf diese Weise zum einen mittels Titrationsexperimenten die Wirksamkeit und die Spezifität des jeweiligen Hemmstoffes analysieren und damit zum anderen feststellen, welche proteasomale Untereinheit für die Degradation des analysierten ubiquitinierten Substrates essentiell ist. Diese Daten könnten einen entscheidenden Beitrag zur Entwicklung medizinischer Strategien leisten, die eine partielle Inhibition des Proteasoms beabsichtigen, um z.B. bei der Tumorbekämpfung gezielt die proteasomale Aktivierung des anti-apoptotisch wirkenden Faktors NF- κ B zu verhindern.

Die vorgestellte *in vitro* Abbau- und Analysemethode ist aber nicht nur als Testsystem für Proteasom-Inhibitoren geeignet, sondern ermöglicht auch die Bewertung von potentiellen peptid-basierten Polyepitop-Vakzinen hinsichtlich ihrer Prozessierbarkeit, also der Effizienz der Epitopgenerierung durch das 26S Proteasom. Die massenspektrometrische Untersuchung der nach Degradation der Polyepitop-Substrate Ub₅-MUC₄ und Ub₅-MUC₈ durch das 26S Proteasom entstandenen Produkte hatte nicht nur eine sehr präzise, sondern auch außerordentlich schnelle Freisetzung des Epitops MUC₁₉₅₀₋₉₅₈ bereits nach 2,5min ergeben. Zudem bestätigte sich die Erwartung, dass die Quantität an generiertem MUC₁₉₅₀₋₉₅₈ mit der Zahl der Epitope innerhalb des Substrates korreliert. Die Ergebnisse reflektieren zum einen das Potential der Polyepitop-Konstrukte Ub₅-MUC₄ und Ub₅-MUC₈ zur effizienten Epitopgenerierung durch das Ubiquitin-Proteasom-System und weisen zum anderen die UFD-basierte Abbaumethode als ein valides Testsystem aus, um die Qualität von synthetischen Epitopfolgen hinsichtlich einer optimierten 26S proteasomalen Produktgenerierung zu analysieren. In Folgeexperimenten ist geplant, mittels MUC₁₉₅₀₋₉₅₈-spezifischer cytotoxischer T-Lymphozyten zu prüfen, ob die im UFD-basierten System *in vitro* ermittelten Ergebnisse auch *ex vivo* gültig sind. Damit soll es gelingen, auf Grundlage der *in vitro* gewonnenen und *ex vivo* validierten Daten eine schlagkräftige 26S Proteasom-basierte Polyepitop-Vakzine zu entwickeln.

5. Literatur

- Adams, G. M., Crotchett, B., Slaughter, C. A., DeMartino, G. N. & Gogol, E. P. (1998). Formation of proteasome-PA700 complexes directly correlates with activation of peptidase activity. *Biochemistry* 37, 12927-32.
- Alonso, L. G., Garcia-Alai, M. M., Smal, C., Centeno, J. M., Iacono, R., Castano, E., Gualfetti, P. & de Prat-Gay, G. (2004). The HPV16 E7 viral oncoprotein self-assembles into defined spherical oligomers. *Biochemistry* 43, 3310-7.
- Archibald, J. M., Teh, E. M. & Keeling, P. J. (2003). Novel ubiquitin fusion proteins: ribosomal protein P1 and actin. *J Mol Biol* 328, 771-8.
- Armstrong, D. J. & Roman, A. (1993). The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues. *Biochem Biophys Res Commun* 192, 1380-7.
- Aviel, S., Winberg, G., Massucci, M. & Ciechanover, A. (2000). Degradation of the epstein-barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *J Biol Chem* 275, 23491-9.
- Babbitt, S. E., Kiss, A., Deffenbaugh, A. E., Chang, Y. H., Bailly, E., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Buranda, T., Sklar, L. A., Baumler, J., Gogol, E. & Skowyra, D. (2005). ATP hydrolysis-dependent disassembly of the 26S proteasome is part of the catalytic cycle. *Cell* 121, 553-65.
- Bachmair, A., Finley, D. & Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234, 179-86.
- Bajorek, M., Finley, D. & Glickman, M. H. (2003). Proteasome disassembly and downregulation is correlated with viability during stationary phase. *Curr Biol* 13, 1140-4.
- Baker, R. T., Tobias, J. W. & Varshavsky, A. (1992). Ubiquitin-specific proteases of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of UBP2 and UBP3, and functional analysis of the UBP gene family. *J Biol Chem* 267, 23364-75.
- Balakirev, M. Y., Tcherniuk, S. O., Jaquinod, M. & Chroboczek, J. (2003). Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. *EMBO Rep* 4, 517-22.
- Benaroudj, N., Zwickl, P., Seemuller, E., Baumeister, W. & Goldberg, A. L. (2003). ATP hydrolysis by the proteasome regulatory complex PAN serves multiple functions in protein degradation. *Mol Cell* 11, 69-78.
- Beninga, J., Rock, K. L. & Goldberg, A. L. (1998). Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem* 273, 18734-42.
- Ben-Shahar, S., Komlosch, A., Nadav, E., Shaked, I., Ziv, T., Admon, A., DeMartino, G. N. & Reiss, Y. (1999). 26 S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate. *J Biol Chem* 274, 21963-72.
- Berezutskaya, E. & Bagchi, S. (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 272, 30135-40.
- Berezutskaya, E., Yu, B., Morozov, A., Raychaudhuri, P. & Bagchi, S. (1997). Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ* 8, 1277-86.
- Borodovsky, A., Kessler, B. M., Casagrande, R., Overkleeft, H. S., Wilkinson, K. D. & Ploegh, H. L. (2001). A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14. *Embo J* 20, 5187-96.
- Bose, S., Stratford, F. L., Broadfoot, K. I., Mason, G. G. & Rivett, A. J. (2004). Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. *Biochem J* 378, 177-84.
- Boyer, S. N., Wazer, D. E. & Band, V. (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 56, 4620-4.
- Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P. M., Finley, D. & Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* 1, 221-6.

- Brayman, M., Thathiah, A. & Carson, D. D. (2004). MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 4.
- Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A. & Ciechanover, A. (1998). A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *Embo J* 17, 5964-73.
- Brossart, P., Heinrich, K. S., Stuhler, G., Behnke, L., Reichardt, V. L., Stevanovic, S., Muhm, A., Rammensee, H. G., Kanz, L. & Brugger, W. (1999). Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* 93, 4309-17.
- Brown, M. G. & Monaco, J. J. (1993). Biochemical purification of distinct proteasome subsets. *Enzyme Protein* 47, 343-53.
- Buschmann, T., Fuchs, S. Y., Lee, C. G., Pan, Z. Q. & Ronai, Z. (2000). SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell* 101, 753-62.
- Cardozo, C. & Michaud, C. (2002). Proteasome-mediated degradation of tau proteins occurs independently of the chymotrypsin-like activity by a nonprocessive pathway. *Arch Biochem Biophys* 408, 103-10.
- Cascio, P., Call, M., Petre, B. M., Walz, T. & Goldberg, A. L. (2002). Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. *Embo J* 21, 2636-45.
- Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, A. F., Rock, K. L. & Goldberg, A. L. (2001). 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *Embo J* 20, 2357-66.
- Cerundolo, V., Kelly, A., Elliott, T., Trowsdale, J. & Townsend, A. (1995). Genes encoded in the major histocompatibility complex affecting the generation of peptides for TAP transport. *Eur J Immunol* 25, 554-62.
- Chen, L., Shinde, U., Ortolan, T. G. & Madura, K. (2001). Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly. *EMBO Rep* 2, 933-8.
- Chen, P. & Hochstrasser, M. (1996). Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* 86, 961-72.
- Chu-Ping, M., Vu, J. H., Proske, R. J., Slaughter, C. A. & DeMartino, G. N. (1994). Identification, purification, and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20 S proteasome. *J Biol Chem* 269, 3539-47.
- Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A. L. & Hershko, A. (1980). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1365-8.
- Coux, O., Tanaka, K. & Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65, 801-47.
- Dahlmann, B., Kuehn, L. & Reinauer, H. (1995). Studies on the activation by ATP of the 26 S proteasome complex from rat skeletal muscle. *Biochem J* 309 (Pt 1), 195-202.
- Del Val, M., Schlicht, H. J., Ruppert, T., Reddehase, M. J. & Koszinowski, U. H. (1991). Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighboring residues in the protein. *Cell* 66, 1145-53.
- DeMartino, G. N., Moomaw, C. R., Zagnitko, O. P., Proske, R. J., Chu-Ping, M., Afendis, S. J., Swaffield, J. C. & Slaughter, C. A. (1994). PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *J Biol Chem* 269, 20878-84.
- Denny, J. B. (2004). Growth-associated protein of 43 kDa (GAP-43) is cleaved nonprocessively by the 20S proteasome. *Eur J Biochem* 271, 2480-93.
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C. & Rechsteiner, M. (1994). A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* 269, 7059-61.
- Di Cola, D. (1992). Human erythrocyte contains a factor that stimulates the peptidase activities of multicatalytic proteinase complex. *Ital J Biochem* 41, 213-24.
- Dick, T. P., Nussbaum, A. K., Deeg, M., Heinemeyer, W., Groll, M., Schirle, M., Keilholz, W., Stevanovic, S., Wolf, D. H., Huber, R., Rammensee, H. G. & Schild, H. (1998). Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J Biol Chem* 273, 25637-46.
- Dick, T. P., Ruppert, T., Groettrup, M., Kloetzel, P. M., Kuehn, L., Koszinowski, U. H., Stevanovic, S., Schild,

- H. & Rammensee, H. G. (1996). Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 86, 253-62.
- Dubiel, W., Ferrell, K. & Rechsteiner, M. (1995). Subunits of the regulatory complex of the 26S protease. *Mol Biol Rep* 21, 27-34.
- Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K. & Rechsteiner, M. (1992). Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 267, 22369-77.
- Eggers, M., Boes-Fabian, B., Ruppert, T., Kloetzel, P. M. & Koszinowski, U. H. (1995). The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides. *J Exp Med* 182, 1865-70.
- Eisenlohr, L. C., Yewdell, J. W. & Bennink, J. R. (1992). Flanking sequences influence the presentation of an endogenously synthesized peptide to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 175, 481-7.
- Emmerich, N. P., Nussbaum, A. K., Stevanovic, S., Priemer, M., Toes, R. E., Rammensee, H. G. & Schild, H. (2000). The human 26 S and 20 S proteasomes generate overlapping but different sets of peptide fragments from a model protein substrate. *J Biol Chem* 275, 21140-8.
- Evans, P. C., Smith, T. S., Lai, M. J., Williams, M. G., Burke, D. F., Heyninck, K., Kreike, M. M., Beyaert, R., Blundell, T. L. & Kilshaw, P. J. (2003). A novel type of deubiquitinating enzyme. *J Biol Chem* 278, 23180-6.
- Eytan, E., Armon, T., Heller, H., Beck, S. & Hershko, A. (1993). Ubiquitin C-terminal hydrolase activity associated with the 26 S protease complex. *J Biol Chem* 268, 4668-74.
- Eytan, E., Ganoth, D., Armon, T. & Hershko, A. (1989). ATP-dependent incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7751-5.
- Falk, K. & Rotzschke, O. (1993). Consensus motifs and peptide ligands of MHC class I molecules. *Semin Immunol* 5, 81-94.
- Fenteany, G. & Schreiber, S. L. (1996). Specific inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome induces a bipolar morphology in neuroblastoma cells. *Chem Biol* 3, 905-12.
- Fenteany, G., Standaert, R. F., Lane, W. S., Choi, S., Corey, E. J. & Schreiber, S. L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268, 726-31.
- Ferrell, K., Wilkinson, C. R., Dubiel, W. & Gordon, C. (2000). Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci* 25, 83-8.
- Finley, D., Ozkaynak, E. & Varshavsky, A. (1987). The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* 48, 1035-46.
- Finley, D., Tanaka, K., Mann, C., Feldmann, H., Hochstrasser, M., Vierstra, R., Johnston, S., Hampton, R., Haber, J., McCusker, J., Silver, P., Frontali, L., Thorsness, P., Varshavsky, A., Byers, B., Madura, K., Reed, S. I., Wolf, D., Jentsch, S., Sommer, T., Baumeister, W., Goldberg, A., Fried, V., Rubin, D. M., Toh-e, A. & et al. (1998). Unified nomenclature for subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome regulatory particle. *Trends Biochem Sci* 23, 244-5.
- Frentzel, S., Kuhn-Hartmann, I., Gernold, M., Gott, P., Seelig, A. & Kloetzel, P. M. (1993). The major-histocompatibility-complex-encoded beta-type proteasome subunits LMP2 and LMP7. Evidence that LMP2 and LMP7 are synthesized as proproteins and that cellular levels of both mRNA and LMP-containing 20S proteasomes are differentially regulated. *Eur J Biochem* 216, 119-26.
- Fu, H., Reis, N., Lee, Y., Glickman, M. H. & Vierstra, R. D. (2001). Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *Embo J* 20, 7096-107.
- Funakoshi, M., Sasaki, T., Nishimoto, T. & Kobayashi, H. (2002). Budding yeast Dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 745-50.
- Fung, P. Y. & Longenecker, B. M. (1991). Specific immunosuppressive activity of epiglycanin, a mucin-like glycoprotein secreted by a murine mammary adenocarcinoma (TA3-HA). *Cancer Res* 51, 1170-6.
- Gaedicke, S., Firat-Geier, E., Constantiniu, O., Lucchiari-Hartz, M., Freudenberg, M., Galanos, C. & Niedermann, G. (2002). Antitumor effect of the human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir: induction of tumor-cell apoptosis associated with perturbation of proteasomal proteolysis. *Cancer Res* 62, 6901-8.
- Giarre, M., Caldeira, S., Malanchi, I., Ciccolini, F., Leao, M. J. & Tommasino, M. (2001). Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome

- p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. *J Virol* 75, 4705-12.
- Glas, R., Bogyo, M., McMaster, J. S., Gaczynska, M. & Ploegh, H. L. (1998). A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. *Nature* 392, 618-22.
- Glickman, M. H. & Adir, N. (2004). The proteasome and the delicate balance between destruction and rescue. *PLoS Biol* 2, E13.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A. & Finley, D. (1998a). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94, 615-23.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fried, V. A. & Finley, D. (1998b). The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* 18, 3149-62.
- Gorbea, C., Taillandier, D. & Rechsteiner, M. (1999). Assembly of the regulatory complex of the 26S proteasome. *Mol Biol Rep* 26, 15-9.
- Groettrup, M., Ruppert, T., Kuehn, L., Seeger, M., Standera, S., Koszinowski, U. & Kloetzel, P. M. (1995). The interferon-gamma-inducible 11 S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20 S proteasome in vitro. *J Biol Chem* 270, 23808-15.
- Groettrup, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T. P., Schild, H., Rammensee, H. G., Koszinowski, U. H. & Kloetzel, P. M. (1996). A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature* 381, 166-8.
- Groettrup, M., Standera, S., Stohwasser, R. & Kloetzel, P. M. (1997). The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8970-5.
- Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A. F., Tanaka, K. & Nakatani, Y. (2003). The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* 113, 357-67.
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H. & Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 7, 1062-7.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D. & Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463-71.
- Groll, M., Heinemeyer, W., Jager, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, D. H. & Huber, R. (1999). The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10976-83.
- Groll, M., Koguchi, Y., Huber, R. & Kohno, J. (2001). Crystal structure of the 20 S proteasome:TMC-95A complex: a non-covalent proteasome inhibitor. *J Mol Biol* 311, 543-8.
- Groll, M., Nazif, T., Huber, R. & Bogyo, M. (2002). Probing structural determinants distal to the site of hydrolysis that control substrate specificity of the 20S proteasome. *Chem Biol* 9, 655-62.
- Gubler, B., Daniel, S., Armandola, E. A., Hammer, J., Caillat-Zucman, S. & van Endert, P. M. (1998). Substrate selection by transporters associated with antigen processing occurs during peptide binding to TAP. *Mol Immunol* 35, 427-33.
- Guterman, A. & Glickman, M. H. (2004a). Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J Biol Chem* 279, 1729-38.
- Guterman, A. & Glickman, M. H. (2004b). Deubiquitinating enzymes are IN/(trinsic to proteasome function). *Curr Protein Pept Sci* 5, 201-11.
- Haldeman, M. T., Xia, G., Kasperek, E. M. & Pickart, C. M. (1997). Structure and function of ubiquitin conjugating enzyme E2-25K: the tail is a core-dependent activity element. *Biochemistry* 36, 10526-37.
- Hayashi, S. (1995). Antizyme-dependent degradation of ornithine decarboxylase. *Essays Biochem* 30, 37-47.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U. & Wolf, D. H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* 272, 25200-9.
- Heinemeyer, W., Gruhler, A., Mohrle, V., Mahe, Y. & Wolf, D. H. (1993). PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J Biol Chem* 268, 5115-20.
- Heink, S., Ludwig, D., Kloetzel, P. M. & Kruger, E. (2005). IFN-gamma-induced immune adaptation of the

- proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9241-6.
- Helt, A. M. & Galloway, D. A. (2001). Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. *J Virol* 75, 6737-47.
- Hendil, K. B., Hartmann-Petersen, R. & Tanaka, K. (2002). 26 S proteasomes function as stable entities. *J Mol Biol* 315, 627-36.
- Hendil, K. B., Khan, S. & Tanaka, K. (1998). Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. *Biochem J* 332 (Pt 3), 749-54.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-79.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A. L. & Rose, I. A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1783-6.
- Hershko, A., Eytan, E., Ciechanover, A. & Haas, A. L. (1982). Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells. Relationship to the breakdown of abnormal proteins. *J Biol Chem* 257, 13964-70.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S. & Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 258, 8206-14.
- Hetfeld, B. K., Bech-Otschir, D. & Dubiel, W. (2005a). Purification method of the COP9 signalosome from human erythrocytes. *Methods Enzymol* 398, 481-91.
- Hetfeld, B. K., Helfrich, A., Kapelari, B., Scheel, H., Hofmann, K., Guterman, A., Glickman, M., Schade, R., Kloetzel, P. M. & Dubiel, W. (2005b). The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1. *Curr Biol* 15, 1217-21.
- Hilt, W. & Wolf, D. H. (1996). Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem Sci* 21, 96-102.
- Hoffman, L. & Rechsteiner, M. (1997). Effects of nucleotides on assembly of the 26S proteasome and degradation of ubiquitin conjugates. *Mol Biol Rep* 24, 13-6.
- Hoffmann, G. (2004). Entwicklung einer Proteasomen-basierten Polyepitop-Plasmid-Vakzine am Beispiel des Tumor-assoziierten Antigens MUC1. *Dissertation*, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Hofmann, R. M. & Pickart, C. M. (1999). Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 96, 645-53.
- Holz, H., Kapelari, B., Kellermann, J., Seemüller, E., Sumegi, M., Udvardy, A., Medalia, O., Sperling, J., Müller, S. A., Engel, A. & Baumeister, W. (2000). The regulatory complex of *Drosophila melanogaster* 26S proteasomes. Subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme. *J Cell Biol* 150, 119-30.
- Hough, R., Pratt, G. & Rechsteiner, M. (1987). Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem* 262, 8303-13.
- Imai, J., Maruya, M., Yashiroda, H., Yahara, I. & Tanaka, K. (2003). The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *Embo J* 22, 3557-67.
- Jäger, S., Groll, M., Huber, R., Wolf, D. H. & Heinemeyer, W. (1999). Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *J Mol Biol* 291, 997-1013.
- Johnson, E. S., Ma, P. C., Ota, I. M. & Varshavsky, A. (1995). A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* 270, 17442-56.
- Johnston, S. C., Riddle, S. M., Cohen, R. E. & Hill, C. P. (1999). Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolases. *Embo J* 18, 3877-87.
- Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Castillo, V. & Goldberg, A. L. (1999a). Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol Cell* 4, 395-402.
- Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Woo, K. M. & Goldberg, A. L. (1999b). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* 274, 3363-71.
- Kisselev, A. F., Callard, A. & Goldberg, A. L. (2006). Importance of the different proteolytic sites of the

- proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem* 281, 8582-90.
- Kisselev, A. F., Kaganovich, D. & Goldberg, A. L. (2002). Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20 S proteasomes. Evidence for peptide-induced channel opening in the alpha-rings. *J Biol Chem* 277, 22260-70.
- Kloetzel, P. M. (2004). Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* 5, 661-9.
- Knowlton, J. R., Johnston, S. C., Whitby, F. G., Realini, C., Zhang, Z., Rechsteiner, M. & Hill, C. P. (1997). Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha). *Nature* 390, 639-43.
- Kobayashi, H., Terao, T. & Kawashima, Y. (1992). Serum sialyl Tn as an independent predictor of poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 10, 95-101.
- Kohler, A., Cascio, P., Leggett, D. S., Woo, K. M., Goldberg, A. L. & Finley, D. (2001). The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* 7, 1143-52.
- Kopp, F., Dahlmann, B. & Kuehn, L. (2001). Reconstitution of hybrid proteasomes from purified PA700-20 S complexes and PA28alphabeta activator: ultrastructure and peptidase activities. *J Mol Biol* 313, 465-71.
- Kruger, E., Kloetzel, P. M. & Enenkel, C. (2001). 20S proteasome biogenesis. *Biochimie* 83, 289-93.
- Kuckelkorn, U., Ferreira, E. A., Drung, I., Liewer, U., Kloetzel, P. M. & Theobald, M. (2002). The effect of the interferon-gamma-inducible processing machinery on the generation of a naturally tumor-associated human cytotoxic T lymphocyte epitope within a wild-type and mutant p53 sequence context. *Eur J Immunol* 32, 1368-75.
- Kuehn, L. & Dahlmann, B. (1996). Reconstitution of proteasome activator PA28 from isolated subunits: optimal activity is associated with an alpha,beta-heteromultimer. *FEBS Lett* 394, 183-6.
- Kunisawa, J. & Shastri, N. (2003). The group II chaperonin TRiC protects proteolytic intermediates from degradation in the MHC class I antigen processing pathway. *Mol Cell* 12, 565-76.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lam, Y. A., DeMartino, G. N., Pickart, C. M. & Cohen, R. E. (1997a). Specificity of the ubiquitin isopeptidase in the PA700 regulatory complex of 26 S proteasomes. *J Biol Chem* 272, 28438-46.
- Lam, Y. A., Lawson, T. G., Velayutham, M., Zweier, J. L. & Pickart, C. M. (2002). A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 416, 763-7.
- Lam, Y. A., Xu, W., DeMartino, G. N. & Cohen, R. E. (1997b). Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature* 385, 737-40.
- Lee, C., Schwartz, M. P., Prakash, S., Iwakura, M. & Matouschek, A. (2001). ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal. *Mol Cell* 7, 627-37.
- Leggett, D. S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R. T., Walz, T., Ploegh, H. & Finley, D. (2002). Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol Cell* 10, 495-507.
- Li, J. & Rechsteiner, M. (2001). Molecular dissection of the 11S REG (PA28) proteasome activators. *Biochimie* 83, 373-83.
- Li, L. & Deng, X. W. (2003). The COP9 signalosome: an alternative lid for the 26S proteasome? *Trends Cell Biol* 13, 507-9.
- Lightcap, E. S., McCormack, T. A., Pien, C. S., Chau, V., Adams, J. & Elliott, P. J. (2000). Proteasome inhibition measurements: clinical application. *Clin Chem* 46, 673-83.
- Lin, L. & Ghosh, S. (1996). A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol Cell Biol* 16, 2248-54.
- Liu, C. W., Corboy, M. J., DeMartino, G. N. & Thomas, P. J. (2003). Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* 299, 408-11.
- Lupas, A., Baumeister, W. & Hofmann, K. (1997). A repetitive sequence in subunits of the 26S proteasome and 20S cyclosome (anaphase-promoting complex). *Trends Biochem Sci* 22, 195-6.
- Lupas, A. N. & Martin, J. (2002). AAA proteins. *Curr Opin Struct Biol* 12, 746-53.
- Ma, C. P., Slaughter, C. A. & DeMartino, G. N. (1992). Identification, purification, and characterization of a

- protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain). *J Biol Chem* 267, 10515-23.
- Munger, K. & Howley, P. M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 89, 213-28.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K. & Ichihara, A. (1992). Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* 360, 597-9.
- Navon, A. & Goldberg, A. L. (2001). Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome. *Mol Cell* 8, 1339-49.
- Niedermann, G., Butz, S., Ihlenfeldt, H. G., Grimm, R., Lucchiari, M., Hoschutzky, H., Jung, G., Maier, B. & Eichmann, K. (1995). Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity* 2, 289-99.
- Niedermann, G., Grimm, R., Geier, E., Maurer, M., Realini, C., Gartmann, C., Soll, J., Omura, S., Rechsteiner, M. C., Baumeister, W. & Eichmann, K. (1997). Potential immunocompetence of proteolytic fragments produced by proteasomes before evolution of the vertebrate immune system. *J Exp Med* 186, 209-20.
- Nishizawa, M., Furuno, N., Okazaki, K., Tanaka, H., Ogawa, Y. & Sagata, N. (1993). Degradation of Mos by the N-terminal proline (Pro2)-dependent ubiquitin pathway on fertilization of *Xenopus* eggs: possible significance of natural selection for Pro2 in Mos. *Embo J* 12, 4021-7.
- Nishizawa, M., Okazaki, K., Furuno, N., Watanabe, N. & Sagata, N. (1992). The 'second-codon rule' and autophosphorylation govern the stability and activity of Mos during the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *Embo J* 11, 2433-46.
- Nussbaum, A. K., Dick, T. P., Keilholz, W., Schirle, M., Stevanovic, S., Dietz, K., Heinemeyer, W., Groll, M., Wolf, D. H., Huber, R., Rammensee, H. G. & Schild, H. (1998). Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12504-9.
- Oberdorf, J., Carlson, E. J. & Skach, W. R. (2001). Redundancy of mammalian proteasome beta subunit function during endoplasmic reticulum associated degradation. *Biochemistry* 40, 13397-405.
- Ogura, T. & Tanaka, K. (2003). Dissecting various ATP-dependent steps involved in proteasomal degradation. *Mol Cell* 11, 3-5.
- Orian, A., Schwartz, A. L., Israel, A., Whiteside, S., Kahana, C. & Ciechanover, A. (1999). Structural motifs involved in ubiquitin-mediated processing of the NF-kappaB precursor p105: roles of the glycine-rich region and a downstream ubiquitination domain. *Mol Cell Biol* 19, 3664-73.
- Orlowski, M., Cardozo, C. & Michaud, C. (1993). Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* 32, 1563-72.
- Orlowski, R. Z. (2004). Bortezomib and its role in the management of patients with multiple myeloma. *Expert Rev Anticancer Ther* 4, 171-9.
- Osmulski, P. A. & Gaczynska, M. (2002). Nanoenzymology of the 20S proteasome: proteasomal actions are controlled by the allosteric transition. *Biochemistry* 41, 7047-53.
- Ossendorp, F., Eggers, M., Neisig, A., Ruppert, T., Groettrup, M., Sijts, A., Mengede, E., Kloetzel, P. M., Neefjes, J., Koszinowski, U. & Melief, C. (1996). A single residue exchange within a viral CTL epitope alters proteasome-mediated degradation resulting in lack of antigen presentation. *Immunity* 5, 115-24.
- Ozkaynak, E., Finley, D., Solomon, M. J. & Varshavsky, A. (1987). The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *Embo J* 6, 1429-39.
- Ozkaynak, E., Finley, D. & Varshavsky, A. (1984). The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature* 312, 663-6.
- Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L. & Maniatis, T. (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 78, 773-85.
- Parmiani, G., Castelli, C., Rivoltini, L., Casati, C., Tully, G. A., Novellino, L., Patuzzo, A., Tosi, D., Anichini, A. & Santinami, M. (2003). Immunotherapy of melanoma. *Semin Cancer Biol* 13, 391-400.
- Pickart, C. M. (1997). Targeting of substrates to the 26S proteasome. *Faseb J* 11, 1055-66.
- Piotrowski, J., Beal, R., Hoffman, L., Wilkinson, K. D., Cohen, R. E. & Pickart, C. M. (1997). Inhibition of the

- 26 S proteasome by polyubiquitin chains synthesized to have defined lengths. *J Biol Chem* 272, 23712-21.
- Prakash, S., Tian, L., Ratliff, K. S., Lehotzky, R. E. & Matouschek, A. (2004). An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation. *Nat Struct Mol Biol* 11, 830-7.
- Preckel, T., Fung-Leung, W. P., Cai, Z., Vitiello, A., Salter-Cid, L., Winqvist, O., Wolfe, T. G., Von Herrath, M., Angulo, A., Ghazal, P., Lee, J. D., Fourie, A. M., Wu, Y., Pang, J., Ngo, K., Peterson, P. A., Fruh, K. & Yang, Y. (1999). Impaired immunoproteasome assembly and immune responses in PA28^{-/-} mice. *Science* 286, 2162-5.
- Princiotta, M. F., Finzi, D., Qian, S. B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgerit, F., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. (2003). Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 18, 343-54.
- Princiotta, M. F., Schubert, U., Chen, W., Bennink, J. R., Myung, J., Crews, C. M. & Yewdell, J. W. (2001). Cells adapted to the proteasome inhibitor 4-hydroxy- 5-iodo-3-nitrophenylacetyl-Leu-Leu-leucinal-vinyl sulfone require enzymatically active proteasomes for continued survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 513-8.
- Rape, M. & Jentsch, S. (2002). Taking a bite: proteasomal protein processing. *Nat Cell Biol* 4, E113-6.
- Redman, K. L. & Rechsteiner, M. (1989). Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a. *Nature* 338, 438-40.
- Reinstein, E., Scheffner, M., Oren, M., Ciechanover, A. & Schwartz, A. (2000). Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene* 19, 5944-50.
- Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., van Veelen, P., Janssen, H., Calafat, J., Drijfhout, J. W. & Neefjes, J. (2003). Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* 18, 97-108.
- Ressing, M. E., Sette, A., Brandt, R. M., Ruppert, J., Wentworth, P. A., Hartman, M., Oseroff, C., Grey, H. M., Melief, C. J. & Kast, W. M. (1995). Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J Immunol* 154, 5934-43.
- Rock, K. L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D. & Goldberg, A. L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-71.
- Rogers, S., Wells, R. & Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364-8.
- Rubin, D. M., Glickman, M. H., Larsen, C. N., Dhruvakumar, S. & Finley, D. (1998). Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *Embo J* 17, 4909-19.
- Saric, T., Chang, S. C., Hattori, A., York, I. A., Markant, S., Rock, K. L., Tsujimoto, M. & Goldberg, A. L. (2002). An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* 3, 1169-76.
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. & Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.
- Schmidtke, G., Emch, S., Groettrup, M. & Holzhutter, H. G. (2000). Evidence for the existence of a non-catalytic modifier site of peptide hydrolysis by the 20 S proteasome. *J Biol Chem* 275, 22056-63.
- Schmidtke, G., Holzhutter, H. G., Bogyo, M., Kairies, N., Groll, M., de Giuli, R., Emch, S. & Groettrup, M. (1999). How an inhibitor of the HIV-I protease modulates proteasome activity. *J Biol Chem* 274, 35734-40.
- Schmidtke, G., Schmidt, M. & Klotzel, P. M. (1997). Maturation of mammalian 20 S proteasome: purification and characterization of 13 S and 16 S proteasome precursor complexes. *J Mol Biol* 268, 95-106.
- Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W. & Bennink, J. R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-4.
- Selvey, L. A., Dunn, L. A., Tindle, R. W., Park, D. S. & Frazer, I. H. (1994). Human papillomavirus (HPV) type 18 E7 protein is a short-lived steroid-inducible phosphoprotein in HPV-transformed cell lines. *J Gen Virol* 75 (Pt 7), 1647-53.

- Sijts, A., Sun, Y., Janek, K., Kral, S., Paschen, A., Schadendorf, D. & Kloetzel, P. M. (2002). The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing. *Mol Immunol* 39, 165-9.
- Sijts, A. J., Ruppert, T., Rehmann, B., Schmidt, M., Koszinowski, U. & Kloetzel, P. M. (2000). Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J Exp Med* 191, 503-14.
- Smits, P. H., Smits, H. L., Jebbink, M. F. & ter Schegget, J. (1990). The short arm of chromosome 11 likely is involved in the regulation of the human papillomavirus type 16 early enhancer-promoter and in the suppression of the transforming activity of the viral DNA. *Virology* 176, 158-65.
- Spence, J., Gali, R. R., Dittmar, G., Sherman, F., Karin, M. & Finley, D. (2000). Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* 102, 67-76.
- Spence, J., Sadis, S., Haas, A. L. & Finley, D. (1995). A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* 15, 1265-73.
- Stohwasser, R., Salzmann, U., Giesebrecht, J., Kloetzel, P. M. & Holzthutter, H. G. (2000). Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. *Eur J Biochem* 267, 6221-30.
- Sun, Y., Sijts, A. J., Song, M., Janek, K., Nussbaum, A. K., Kral, S., Schirle, M., Stevanovic, S., Paschen, A., Schild, H., Kloetzel, P. M. & Schadendorf, D. (2002). Expression of the proteasome activator PA28 rescues the presentation of a cytotoxic T lymphocyte epitope on melanoma cells. *Cancer Res* 62, 2875-82.
- Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, K. B. & Tanaka, K. (2000). Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 275, 14336-45.
- Teicher, B. A., Ara, G., Herbst, R., Palombella, V. J. & Adams, J. (1999). The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 5, 2638-45.
- Theobald, M., Ruppert, T., Kuckelkorn, U., Hernandez, J., Haussler, A., Ferreira, E. A., Liewer, U., Biggs, J., Levine, A. J., Huber, C., Koszinowski, U. H., Kloetzel, P. M. & Sherman, L. A. (1998). The sequence alteration associated with a mutational hotspot in p53 protects cells from lysis by cytotoxic T lymphocytes specific for a flanking peptide epitope. *J Exp Med* 188, 1017-28.
- Thomson, S. A., Khanna, R., Gardner, J., Burrows, S. R., Coupar, B., Moss, D. J. & Suhrbier, A. (1995). Minimal epitopes expressed in a recombinant polyepitope protein are processed and presented to CD8+ cytotoxic T cells: implications for vaccine design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5845-9.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. & Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* 19, 94-102.
- Turnell, A. S., Grand, R. J., Gorbea, C., Zhang, X., Wang, W., Mymryk, J. S. & Gallimore, P. H. (2000). Regulation of the 26S proteasome by adenovirus E1A. *Embo J* 19, 4759-73.
- Uebel, S., Meyer, T. H., Kraas, W., Kienle, S., Jung, G., Wiesmuller, K. H. & Tampe, R. (1995). Requirements for peptide binding to the human transporter associated with antigen processing revealed by peptide scans and complex peptide libraries. *J Biol Chem* 270, 18512-6.
- van Hall, T., Sijts, A., Camps, M., Offringa, R., Melief, C., Kloetzel, P. M. & Ossendorp, F. (2000). Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J Exp Med* 192, 483-94.
- van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D. M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D. & Vierstra, R. D. (1996). The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol Cell Biol* 16, 6020-8.
- Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12142-9.
- Velders, M. P., Weijzen, S., Eiben, G. L., Elmishad, A. G., Kloetzel, P. M., Higgins, T., Ciccarelli, R. B., Evans, M., Man, S., Smith, L. & Kast, W. M. (2001). Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. *J Immunol* 166, 5366-73.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R., 3rd, Koonin, E. V. & Deshaies, R. J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298, 611-5.

- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* 1, 945-51.
- Walz, J., Erdmann, A., Kania, M., Typke, D., Koster, A. J. & Baumeister, W. (1998). 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J Struct Biol* 121, 19-29.
- Wei, N. & Deng, X. W. (2003). The COP9 signalosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 261-86.
- Weissman, A. M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 169-78.
- Wenzel, T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. & Baumeister, W. (1994). Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS Lett* 349, 205-9.
- Whitby, F. G., Masters, E. I., Kramer, L., Knowlton, J. R., Yao, Y., Wang, C. C. & Hill, C. P. (2000). Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* 408, 115-20.
- Whittier, J. E., Xiong, Y., Rechsteiner, M. C. & Squier, T. C. (2004). Hsp90 enhances degradation of oxidized calmodulin by the 20 S proteasome. *J Biol Chem* 279, 46135-42.
- Wilkinson, C. R., Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C. & Gordon, C. (2001). Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol* 3, 939-43.
- Wilkinson, K. D. (1997). Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *Faseb J* 11, 1245-56.
- Yamano, T., Murata, S., Shimbara, N., Tanaka, N., Chiba, T., Tanaka, K., Yui, K. & Udono, H. (2002). Two distinct pathways mediated by PA28 and hsp90 in major histocompatibility complex class I antigen processing. *J Exp Med* 196, 185-96.
- Yao, T. & Cohen, R. E. (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 419, 403-7.
- Yao, Y., Huang, L., Krutchinsky, A., Wong, M. L., Standing, K. G., Burlingame, A. L. & Wang, C. C. (1999). Structural and functional characterizations of the proteasome-activating protein PA26 from *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 274, 33921-30.
- Yeh, E. T., Gong, L. & Kamitani, T. (2000). Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* 248, 1-14.
- Yoshimura, T., Kameyama, K., Takagi, T., Ikai, A., Tokunaga, F., Koide, T., Tanahashi, N., Tamura, T., Cejka, Z., Baumeister, W. & et al. (1993). Molecular characterization of the "26S" proteasome complex from rat liver. *J Struct Biol* 111, 200-11.
- Yukawa, M., Sakon, M., Kambayashi, J., Shiba, E., Kawasaki, T., Ariyoshi, H. & Mori, T. (1991). Proteasome and its novel endogeneous activator in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 178, 256-62.
- Zhang, Z., Clawson, A., Realini, C., Jensen, C. C., Knowlton, J. R., Hill, C. P. & Rechsteiner, M. (1998). Identification of an activation region in the proteasome activator REGalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2807-11.
- Zhang, Z., Krutchinsky, A., Endicott, S., Realini, C., Rechsteiner, M. & Standing, K. G. (1999). Proteasome activator 11S REG or PA28: recombinant REG alpha/REG beta hetero-oligomers are heptamers. *Biochemistry* 38, 5651-8.
- Zwickl, P. & Baumeister, W. (1999). AAA-ATPases at the crossroads of protein life and death. *Nat Cell Biol* 1, E97-8.
- Zwickl, P., Baumeister, W. & Steven, A. (2000). Dis-assembly lines: the proteasome and related ATPase-assisted proteases. *Curr Opin Struct Biol* 10, 242-50.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | | | |
|-------------------|---|----------|---|
| A | Absorption | MS | Massenspektrometrie |
| AA | Aminosäuren | NEM | N-Ethylmaleimid |
| Abb. | Abbildung | OD | Optische Dichte |
| AMC | 7-Amido-4-Methylcoumarin | ODC | Ornithin-Decarboxylase |
| APS | Ammoniumpersulfat | o-PT | ortho-Phenanthrolin |
| BrAAP | <i>branched chain amino acid- preferring</i> | Ova | Ovalbumin |
| Bz- | Benzoyl- | PAGE | Polyacrylamidgel-Elektrophorese |
| Bz-VGR | Bz-Valin Glycin Arginin- | PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| β_2m | β_2 -Mikroglobulin | PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| ChT-L | Chymotrypsin-ähnlich | PGPH | Peptidylglutamyl-Peptidhydrolase |
| CP | 20S <i>core</i> -Partikel | PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| DEAE | Diethyl-Aminoethyl | RING | <i>really interesting new gene</i> |
| dH ₂ O | deionisiertes Wasser | RIPA | <i>radioimmunoprecipitation assay</i> |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium | RFLU | <i>relative fluorescence unit</i> |
| DMF | N,N-Dimethylformamid | rpm | <i>rounds per minute</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | RP | <i>regulatory particle (19S)</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | Rpn | <i>regulatory particle nonATPase</i> |
| DUB | deubiquitinierendes Enzym | Rpt | <i>regulatory particle ATPase</i> |
| ECL | <i>enhanced chemiluminescence</i> | RT | Raumtemperatur |
| EDTA | Ethylendiamin-Tetraacetat | sec | Sekunden |
| EGFP | <i>enhanced green fluorescent protein</i> | SDS | Natriumdodecylsulfat |
| EI | Ethylenimin | SNAAP | <i>small neutral amino acid- preferring</i> |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum | Suc | Succinyl- |
| <i>et al.</i> | und andere | Suc-LLVY | Suc-Leucin Leucin Valin Tyrosin- |
| FCS | fötale Kälberserum | TAP | <i>transporter associated with antigen processing</i> |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat | T-L | Trypsin-ähnlich |
| FPLC | <i>fast protein liquid chromatography</i> | TFA | Trifluor-Essigsäure |
| g | Erdbeschleunigung ($1g=9,8 \text{ m/s}^2$) | TPPII | Tripeptidylpeptidase II |
| GST | Glutathion-S-Transferase | U | <i>unit</i> |
| h | Stunde | Ub | Ubiquitin |
| H-AAF | H-Alanin Alanin Phenylalanin- | UBP | <i>Ub-specific processing protease</i> |
| HLA | <i>human leukocyte antigen</i> | UCH | <i>Ub carboxy-terminal hydrolase</i> |
| IFN γ | Interferon γ | ü.N. | über Nacht |
| IPTG | Isopropyl-Thio- β -Galaktosid | UFD | <i>Ub fusion degradation</i> |
| kb | Kilobase | UPS | Ubiquitin-Proteasom-System |
| kDa | Kilodalton | VNTR | <i>variable numbers of tandem repeats</i> |
| LB | Luria-Bertani-Medium | v/v | <i>volumn per volumn</i> |
| M | molar | w/v | <i>weight per volumn</i> |
| MALDI | Matrix-unterstützte Laser- Desorption/Ionisation | Z | Benzoyloxycarbonyl- |
| MHC | <i>major histocompatibility complex</i> | Z-GGL | Z-Glycin Glycin Leucin- |
| min | Minute | Z-LLE | Z-Leucin Leucin Glutamat- |

PUBLIKATIONEN

Barré, F. X., Aroyo, M., Colloms, S. D., **Helfrich, A.**, Cornet, F., and Sherratt, D. J. (2000). FtsK functions in the processing of a Holliday junction intermediate during bacterial chromosome segregation. *Genes Dev* 14, 2976-2988.

Hetfeld, B. K. J, **Helfrich, A.**, Kapelari, B., Scheel, H., Hofmann, K., Guterman, A., Glickman, M., Schade, S., Kloetzel, P. M. and Dubiel, W. (2005). The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1. *Curr Biol* 15, 1217-1221.

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich herzlich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Peter-Michael Kloetzel für das sehr interessante Thema der Promotionsarbeit und die Möglichkeit, dieses in der Arbeitsgruppe Prof. Kloetzel unter hervorragenden Bedingungen selbständig und eigenverantwortlich bearbeiten zu können.

Dr. Alice Sijts und Dr. Michael Seeger möchte ich für die Diskussionsbereitschaft und die hilfreichen praktischen Tipps danken.

Prof. Burkhardt Dahlmann danke ich für die Einführung in die Kunst der 26S Proteasom-Isolierung und den zur Verfügung gestellten PA28-Komplex.

Bei Dr. Paul Sheppard, Prof. Wolfgang Dubiel und Bettina Hetfeld bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

Mein herzlicher Dank geht an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Prof. Kloetzel für die angenehme und produktive Arbeitsatmosphäre und besonders an

Dr. Ulrike Seifert, Dr. Ulrike Kuckelkorn, Dr. Katharina Janek, Alexander Kloß und Dagmar Siele für Rat und Tat sowie

Dr. Michael Seeger, Sybille Standera und Andrea Schulze für die exzellente Stimmung an der *bench*.

Für ihre Unterstützung danke ich meinen Eltern sowie Martin und Annette.

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Berlin, Mai 2006

Annett Helfrich